VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER PHARMAKODYNAMISCHEN UND BIOCHEMISCHEN WIRKUNG EINIGER NATÜRLICHER UND HALBSYNTHETISCHER CARDENOLIDE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Hoda Tawfik

aus Kairo / Ägypten

Düsseldorf 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN DER PHARMAKODYNAMISCHEN UND BIOCHEMISCHEN WIRKUNG EINIGER NATÜRLICHER UND HALBSYNTHETISCHER CARDENOLIDE

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Hoda Tawfik

aus Kairo / Ägypten

Düsseldorf 1983

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Greeff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Möhrle
Tage der mündlichen Prüfung: 7.11.- 10.11.-15.11.1983

MEINEN ELTERN GEWIDMET

إلى أعز الناس عندي
أمي و أبي

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0023

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	4
1.	Nachweis und Charakterisierung der pharmakodynamischen Wirkung der Cardenolide	4
2.	Nachweis und Charakterisierung der biochemischen Wirkung der Cardenolide	5
3.	Zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Cardenolide	5
4.	Bisherige Untersuchungen mit semisynthetischen Cardenoliden	12
5.	Ziel der vorliegenden Untersuchungen	18
B.	METHODIK	19
1.	Versuche an isolierten Meerschweinchenvorhöfen	19
2.	Versuche an Papillarmuskeln des Meerschweinchens	20
3.	Wirkungsgeschwindigkeit und Haftbarkeit der Cardenolide am Vorhofgewebe	20
4.	Isolierung der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase aus Meerschweinchenherzen	21
5.	Proteinbestimmung	23
6.	Aktivitätsbestimmung durch gekoppelte Ein-Substrat-Reaktion	25
7.	Bestimmung der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase	27
8.	^3H-Ouabain-Bindungsstudien	29
	a) Zeitabhängige Verdrängung des ^3H-Ouabain	29
	b) Konzentrationsabhängige Verdrängung	30
9.	Statistische Methode	31
10.	Verwendete Chemikalien und Glykoside	32

Seite

C. ERGEBNISSE 37

1. Die positiv inotrope Wirkung der Cardenolide am isolierten Vorhof des Meerschweinchens 37

a) Vergleich der Affinität und der intrinsischen Aktivität 38

b) Hinweis auf die therapeutische Breite 44

2. Einfluß der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Wirkung der Cardenolide 46

3. Versuche mit dem Borsäureester 54

4. Versuche an Meerschweinchenpapillarmuskeln 55

5. Vergleich der Wirkungs- und Abklinggeschwindigkeit der Cardenolide am Vorhof des Meerschweinchens 58

6. Hemmung der kardialen Na^+,K^+-ATPase Aktivität 63

7. Bindungsstudien am Meerschweinchenherzhomogenat 68

a) Zeitabhängige Verdrängung des ^3H-Ouabain 68

b) Konzentrationsabhängige Verdrängung 72

D. DISKUSSION 76

1. Versuche an isolierten elektrisch gereizten Herzpräparaten 76

a) Cardenolide der Convallatoxingruppe 76

b) Weitere Cardenolide, die k-Strophanthidin als Aglykon haben 83

c) Allgemeiner Vergleich aller untersuchten Cardenolide mit k-Strophanthidin als Aglykon 84

d) Cardenolide der Digitalisgruppe 85

Seite

2. Bindungsstudien und Versuche an Na^+,K^+-ATPase 88

3. Die Bedeutung der extrazellulären Calciumkonzentration 90

4. Schlußbemerkung 93

E. ZUSAMMENFASSUNG 97

F. LITERATURVERZEICHNIS 100

A. EINLEITUNG

Die Wirkung der Cardenolide läßt sich pharmakologisch aufgrund ihrer pharmakodynamischen und biochemischen Eigenschaften charakterisieren. In der vorliegenden Dissertation wurden einige halbsynthetische Cardenolide in dieser Beziehung pharmakologisch untersucht und in ihrer Wirkung mit bekannten Glykosiden verglichen.

1. Nachweis und Charakterisierung der pharmakodynamischen Wirkung der Cardenolide

Zur Wertbestimmung der Glykosidpräparate wurde viele Jahrzehnte lang die intravenöse Titration von narkotisierten Versuchstieren benutzt. Dabei wird den Tieren langsam intravenös eine Glykosidlösung infundiert bis Arrhythmien und nachfolgend ein Herzstillstand auftritt. So war z.B. die Letaldosis an der Katze (Hatcher und Brody, 1910) oder die Letaldosis an Meerschweinchen (Knaffl-Lenz, 1926) eine wichtige Grundlage für die Dosierung an Menschen. Darüberhinaus wurden zahlreiche Untersuchungen an Herzlungenpräparaten des Hundes und der Katze durchgeführt, um die kardiale Wirkung der Cardenolide in ihrer pharmakodynamischen Wirkung zu analysieren (Übersicht bei Weese, 1936; Lendle 1933). Außerdem wurden in der Literatur Methoden zur Bewertung der Glykoside an isolierten Herzpräparaten verschiedener

Tierarten beschrieben (Übersicht: Reiter, 1981, Greeff und Hafner, 1981).

Da sich isolierte Präparate aus Menschen- und Meerschweinchenvorhöfen gegenüber herzwirksamen Glykosiden ähnlich verhalten (Greeff und Schlieper, 1967; Sukenobu, 1975), wurden in der vorliegenden Arbeit zur Bewertung der pharmakodynamischen Wirkung der Cardenolide isolierte, elektrisch gereizte, linke Meerschweinchenvorhöfe verwendet. Diese Methode wurde vielfach für diesen Zweck benutzt (Übersicht: Greeff und Hafner, 1981).

2. Nachweis und Charakterisierung der biochemischen Wirkung der Cardenolide

In biochemischen Untersuchungen wurde die hemmende Wirkung der Cardenolide auf die Aktivität der Na^+,K^+-aktivierbaren Membran-ATPase geprüft. Die Existenz dieses Enzyms wurde zuerst von Skou (1957) in mikrosomalen Fraktionen von Krebsnerven festgestellt. Zur Messung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität zeigt sich die gekoppelte spektrophotometrische Nachweismethode von Akera (1969) und Nakao (1965) als besonders günstig. Diese Methode sichert eine konstante Substratkonzentration bei fehlender Endprodukthemmung und ermöglicht eine fortlaufende Beobachtung der Enzymreaktion während der gesamten Versuchszeit.

Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung der Wirkung der Cardenolide bietet sich durch Bindungsstudien, die Auskunft über die Affinität der Glykoside auf biochemischer Basis ermöglicht.

3. Zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Cardenolide

Eine Aufklärung des biochemischen Mechanismus der Digitalisglykoside ist Voraussetzung zum Verständnis ihrer Wirkung.
Aus diesem Grund sollen die biochemischen, grundlegenden Mechanismen der Kontraktion der Muskelzelle und unsere Vorstellungen über den Mechanismus der positiv inotropen Wirkung der Cardenolide kurz dargestellt werden.

Ausschlaggebend für die Kontraktion sind elektrophysiologische Prozesse an der Zellmembran. Eine langsame Repolarisation folgt einer schnellen Depolarisation. Die physikochemische Basis ist ein schneller Natriumeinstrom, dem ein langsamer Calciumeinstrom folgt. Die Repolarisationsphase wird von einem Kaliumausstrom bestimmt. Danach ist die Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellulärraum verändert. Intrazellulär ist der Gehalt an Natrium-

und Calciumionen erhöht und der Gehalt an Kaliumionen vermindert.

Durch eine Erhöhung des intrazellulären Calcium verbinden sich Calciumionen mit einem Protein, dem Troponin C, das sich auf den Aktinfilamenten befindet. Hiermit wird eine Konformationsänderung dieses Proteins hervorgerufen, die eine Wechselwirkung zwischen Aktin- und Myosinfilamenten ermöglicht. Die Filamente gleiten ineinander (sliding filaments), so daß eine Verkürzung der Muskelfaser, d.h. eine Kontraktion zustande kommt. Um den Ausgangszustand wieder herbeizuführen, muß die ursprüngliche Ionenverteilung wieder hergestellt werden. Intrazelluläre Calciumionen werden teilweise über eine aktive Calciumpumpe aus dem Sarkoplasma in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen und zum Teil in den extrazellulären Raum zurückgepumpt. Intrazelluläre Natriumionen und extrazelluläre Kaliumionen werden über einen aktiven Natrium-Kalium-Austauschmechanismus wieder zurückgepumpt. Für diesen Mechanismus ist die membranständige Na^+,K^+-ATPase verantwortlich. Eine Änderung der Muskelkontraktion durch Pharmaka kann durch eine Beeinflussung des Ionenaustausches oder Ionentransportes, die bei Kontraktion oder Erschlaffung stattfinden, verursacht werden.

Calciumionen spielen nach heutigen Vorstellungen eine entscheidende Rolle für Kontraktion und Relaxation der Myokardzelle. Eine Beziehung zwischen der Calciumkonzentration des Inkubationsmilieus und der Wirksamkeit der Herzglykoside wies Reiter (1963 und 1968) in Versuchen an isolierten Meerschweinchenpapillarmuskeln nach. Dabei ergab sich, daß herzwirksame Glykoside in Abwesenheit von Calcium in der Badflüssigkeit keine positiv inotrope Wirkung haben.

Mehrere Autoren behaupten, daß herzwirksame Glykoside durch eine Bindung mit der Na^+,K^+-aktivierbaren ATPase Calciumbindungsstellen im Sarkolemm schaffen (Besch und Schwartz, 1970; Gervais et al., 1977; Lüllmann und Peters, 1979).
Wie vorher erwähnt, spielt die Na^+,K^+-ATPase eine zentrale Rolle für die Aufrechterhaltung des Ionengradienten an der Zellmembran. Herzglykoside haben einen hemmenden Einfluß auf dieses Transportsystem (Glynn, 1964; Skou, 1965). Das deutet daraufhin, daß dieses Protein spezifische Rezeptoren für herzwirksame Glykoside darstellt (Greeff, 1963; Akera, 1971).

Viele Autoren haben versucht, Beweise dafür zu erbringen, daß die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase des Herzens Ursache und Mechanismus für die positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside ist (Dransfeld et al., 1966 Repke und Portius, 1963; Repke, 1965; Repke et al., 1965; Schwartz et al., 1969; Akera et al., 1969 und 1970; Lee et al., 1970; Nakamaru und Schwartz, 1970; Besch und Schwartz, 1970; Prindel et al., 1971; Akera et al., 1973; Schwartz et al., 1975; Akera und Brody, 1978). Akera et al. (1969) zeigten, daß die Aktivität der kardialen Na^+,K^+-ATPase durch Ouabain in situ gehemmt wird, wenn ein positiv inotroper Effekt eintritt. Dies wurde von Besch et al. (1970) und Akera et al. (1970) bestätigt. Die Hemmung der kardialen Na^+,K^+-ATPase durch Ouabain und die Bindung des ^3H-Ouabain am Enzym (Akera, 1973) korrelierten mit der positiv inotropen Wirkung am Herz des Hundes. Andere Arbeitsgruppen haben diesen Zusammenhang infrage gestellt (Übersicht: Okita, 1977). Roth-Schechter et al. (1970) untersuchten die Wirkung von zwei semisynthetischen Herzglykosiden, Strophanthidin-3-bromoacetat und Strophanthidol-3-bromoacetat, an Kaninchenvorhöfen und auf die Na^+,K^+-ATPase Aktivität. Die zwei Glykoside hatten eine hohe Wirkungsgeschwindigkeit, und die positiv inotrope Wirkung ließ sich schnell und gut auswaschen. Die ausgewaschenen Vorhöfe, an denen die positiv inotrope Wirkung vollständig verschwunden

war, wurden nun für die Präparation der Na^+,K^+-ATPase benutzt und die Aktivität des Enzyms gemessen. Es stellte sich heraus, daß zu dem Zeitpunkt, zu dem keine positiv inotrope Wirkung mehr vorhanden war, eine deutliche Hemmung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität bestand. Das Gleiche haben Okita et al. (1973) in Versuchen an Langendorff-Herzen von Kaninchen festgestellt, bei denen die positiv inotrope Wirkung abgeklungen war. Daraus schließen auch diese Autoren, daß die Hemmung der kardialen Na^+,K^+-ATPase nicht für die kardiale Wirkung der Herzglykoside verantwortlich ist.

Diese Schlußfolgerung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen vertreten. Thomas et al. (1974) untersuchten die positiv inotrope Wirkung an Meerschweinchenvorhöfen einiger semisynthetischer Cardenolide und ihren Einfluß auf die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase. Sie stellten fest, daß keine deutliche Korrelation zwischen der positiv inotropen Wirkung der Cardenolide und der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität bestand.

Ten Eick et al. (1973) untersuchten die elektrophysiologische Wirkung von Strophanthidin-3-bromoacetat auf das Aktionspotential des Kaninchen-Papillarmuskels. Sie untersuchten auch den Effekt auf die Kontraktionskraft des Muskels und die Wirkung auf die kardiale Na^+,K^+-ATPase. Sie vertraten die Meinung, daß es keine klare Korrelation

zwischen der positiv inotropen Wirkung einerseits und der elektrophysiologischen Wirkung und der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase anderseits gibt.

In Versuchen am elektrisch gereizten Myometrium (Uterusgewebe) des Kaninchens konnten Murthy et al. (1974) keine Korrelation zwischen der Wirkung von Digitoxin und Ouabain auf die Kontraktionskraft und auf die Na^+,K^+-ATPase nachweisen.

Rhee et al. (1976) prüften die Korrelation zwischen der Hemmung der kardialen Na^+,K^+-ATPase, der positiv inotropen Wirkung und der toxischen Wirkung von Ouabain an narkotisierten Hunden.
Zavecz und Dutta (1977) untersuchten die Beziehung zwischen der Hemmung des Enzyms und dem Auftreten von Arrhythmien bei der Infusion des semisynthetischen Glykosids Actodigin an narkotisierten Hunden.
In beiden Arbeiten wurde eine klare Korrelation zwischen der Hemmung der Enzymaktivität und der toxischen Wirkung der Herzglykoside festgestellt.

Aus Untersuchungen über den Einfluß der Herzglykoside auf das Transportenzym, d.h. die Na^+,K^+-ATPase, ergibt sich also eine enge Beziehung zwischen dem Einfluß bzw. der Hemmung der Glykoside auf die Enzymaktivität und ihrer therapeutischen oder toxischen Wirkung.

4. Bisherige Untersuchungen mit semisynthetischen Cardenoliden

Bis heute sind herzwirksame Glykoside unentbehrlich zur Behandlung der Herzinsuffizienz. Die geringe therapeutische Breite, definiert als das Verhältnis zwischen therapeutischer und toxischer Wirkung ist nach wie vor ein ernsthaftes Problem ihrer praktischen Anwendung. Die Häufigkeit der Intoxikation bei der Therapie mit Digitalisglykosiden liegt nach Angaben der Literatur bei 8 - 25 % (Gotsman und Schrire, 1966; Chung, 1969; Hurwitz und Wade, 1969; Shapiro et al., 1969; Beller et al., 1971; Gilfrich und Schölmerich, 1975; Smith, 1975; Doering et al., 1977 a, b). Es wurden deshalb vielfach Bemühungen angestellt, neue Cardenolide zu synthetisieren, die eine größere therapeutische Breite besitzen als die bekannten herzwirksamen Glykoside (Chen, 1970; Goldstein et al., 1974; Brown et al., 1980).

1968 synthetisierten Stevens et al. das Aminozuckerglykosid ASI-222 (Digitoxigenin-4-amino-4,6-dideoxygalaktosid). Seine Wirkung wurde weiter von Foussard-Balnpin (1973), Cardwell und Nash (1976, 1978), Cook et al. (1977) und Choay et al. (1978) untersucht.

Cardwell und Nash (1976) verglichen die Toxizität von ASI 222 und Ouabain an Mäusen nach intraperitonealer Injektion und fanden, daß die LD_{50} für ASI 222 etwa

doppelt so hoch ist als die von Ouabain und die tödliche Wirkung wesentlich später eintritt. In Versuchen an linken Vorhöfen von Kaninchen und am narkotisierten Hund beobachteten sie, daß ASI 222 eine stärkere positiv inotrope Wirkung und eine höhere Wirkungsgeschwindigkeit als Digoxin und Ouabain hat. Außerdem errechneten sie den Quotienten zwischen der letalen Konzentration und derjenigen, die einen 50%igen Anstieg der Kontraktionskraft verursachte; sie nannten diesen Quotienten "therapeutischen Index" und fanden für ASI 222 einen wesentlich höheren Index als für Ouabain oder Digoxin.

1978 beobachteten dieselben Autoren, daß ASI 222 und ASI 254 (Digitoxigeninmonoaminodeoxyglucosid) die Na^+,K^+-ATPase Aktivität stärker hemmt als Digoxin.

Cook et al. (1977) führten weitere Versuche an narkotisierten Hunden mit ASI 222 durch. Der Effekt dieses Glykosids auf die Kontraktilität des Herzens, gemessen an dp/dt_{max}, war doppelt so stark wie der des Digoxins. In den erwähnten Arbeiten kamen die Autoren zu der Schlußfolgerung, daß ein Stickstoffatom im Zuckerteil besser zu der spezifischen Rezeptorkonfiguration paßt.

Als weiteres Digitoxinderivat wurde Actodigin synthetisiert, ein ß-Glykosid eines Digitoxigenin-Isomers, bei dem der Laktonring an C 22 statt an C 20 mit dem steroidalen Gerüst verknüpft ist.

Pharmakologische Arbeiten ergaben, daß Actodigin an isolierten Herzpräparaten eine ähnliche positiv inotrope Wirkung wie Digoxin und Digitoxin hat (Pastlein und Mendez, 1972; Mendez et al., 1974; Thomas et al., 1979; Charnock et al., 1980 a und b) und darüberhinaus über besondere Eigenschaften verfügt:

1.) Die Wirkung an isolierten Herzpräparaten und in elektrophysiologischen Untersuchungen tritt sehr schnell ein.
2.) Die Wirkung ist sehr schnell reversibel auch nachdem schon toxische Effekte aufgetreten sind.

Ein weiteres semisynthetisches Digitoxinderivat, das 3-α-Methyldigitoxigenin ß-glucosid (AL 107), (Abb. 4) wurde von mehreren Autoren geprüft (Fath et al., 1979; Lüllmann et al., 1979; Herbst et al., 1980; Niehus et al., 1980; Klatt, 1980; Chen und Fricke, 1981; Philipsborn, 1981; Lüllmann und Mohr, 1982). AL 107 unterscheidet sich gegenüber Digitoxin durch eine höhere Wirkungsgeschwindigkeit und eine höhere Affinität zum Herzgewebe. Einige in dieser

Arbeit mitgeteilte Untersuchungsergebnisse bestätigen dieses. Lüllmann et al. (1979) vermuteten daß AL 107 eine größere therapeutische Breite als Digitoxin hat.

Die Prüfung neuer herzwirksamer Glykoside hat Haustein in mehreren Arbeiten beschäftigt. In einer Arbeit von 1974 stellte er fest, daß durch Substitution an der C-12- bzw.C-19-Hydroxylgruppe mit Alkylresten verschiedener Längen die Glykosidwirkung um das 10- bis 100-fache vermindert war. Andererseits wird durch eine Acetylierung der C-16-α- bzw. C-16-ß-Hydroxylgruppe die Aktivität des Glykosids auf das 6- bzw. 8-fache erhöht. Eine Acylierung im Zuckerteil führte zu einer Abnahme der Wirkung. 1980 untersuchte Haustein C-19-Nitratester von Geninen und Glykosiden an isolierten linken Meerschweinchenvorhöfen und am isolierten Meerschweinchendarm. Er stellte fest, daß die Glykosidnitrate ähnlich wie andere herzwirksame Glykoside eine kontrahierende Wirkung auf den Darm besitzen, die mit der positiv inotropen Wirkung auf Vorhöfe korreliert ist. Die Geninnitratester hatten dagegen in positiv inotrop wirksamen Konzentrationen einen relaxierenden Effekt auf die Darmmuskulatur.

Unter den von uns untersuchten Substanzen befindet sich ebenfalls ein Glykosid, dessen Aglykon verestert wurde,und zwar Convallatoxinacetonidborsäureester (CAcBE).

Nach Tamm (1963) sind die chemischen Voraussetzungen für eine positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside folgende Strukturmerkmale des Aglykons:

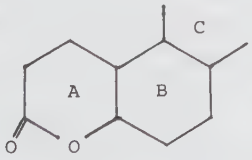
1.) Ein Cyclopentanoperhydrophenanthren-Gerüst,
2.) eine 14-ß-Hydroxysteroidale Konfiguration,
3.) eine Cis-Verknüpfung zwischen den Ringen A und B, C und D und eine Transverknüpfung zwischen B und C,
4.) ein ungesättigter Laktonring an C 17 in ß-Stellung,
5.) eine ß-glykosidische Verknüpfung an C 3.

In den letzten Jahren wurden jedoch Substanzen synthetisiert, bei denen die Bedingungen modifiziert wurden.

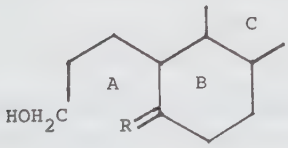
Thomas et al. (1974) haben eine Reihe semisynthetischer Digitoxinderivate untersucht, bei denen der Laktonring durch eine offene Kette ersetzt wurde. Die Aktivität einiger Derivate war mit der der Ausgangssubstanz, Digitoxigenin, vergleichbar. Andere waren weniger aktiv, wirkungslos oder hatten sogar eine negativ

inotrope Wirkung an Meerschweinchenvorhöfen. Im Unterschied zu den meisten herzwirksamen Glykosiden bestand bei den von Thomas et al. (1974) untersuchten Verbindungen keine klare Korrelation zwischen der positiv inotropen Wirkung an Vorhöfen des Meerschweinchens und der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität aus Meerschweinchenherzgewebe.

Andere Autoren untersuchten Cardenolide, bei denen das Steroid Skelett modifiziert wurde. Tsuru et al. (1977) testeten Digitoxigeninderivate, die am Ring A modifiziert waren, an Meerschweinchenvorhöfen und an Froschherzen (wie z.B. Verbindungen mit heterocyclischem Ring A



oder Verbindungen, bei denen der "Ring A" geöffnet ist).



Diese Derivate hatten eine positiv inotrope Wirkung an den Herzpräparaten, aber die Intensität der Wirkung war unterschiedlich. Daraus schließen Tsuru et al. (1977), daß ein intaktes Cyclopentanoperhydrophenanthren-

Gerüst bei herzaktiven Cardenoliden nicht unersetzbar ist. Auch die Cis-Verknüpfung zwischen Ring A und B wurde infrage gestellt: nach Patnaik und Dhawan (1978) und Patnaik und Köhler (1978) hat das Cardenolid Asclepin,das eine Transverknüpfung zwischen Ring A und B besitzt, in vitro und in vivo eine höhere Aktivität als Digoxin. Nach Versuchen an isolierten Meerschweinchenvorhofpräparaten und narkotisierten Katzen vermuteten die Autoren, daß Asclepin eine größere therapeutische Breite besitzt.

5. Ziel der vorliegenden Untersuchungen

Für unsere Untersuchungen standen uns 6 semisynthetische Cardenolide der Firma Gödecke und ein weiteres Glykosid der Firma Knoll (AL 107) zur Verfügung, dessen Wirkung in den vergangenen Jahren von mehreren anderen Autoren untersucht worden ist (vgl. Seite 14).
Vergleichsweise wurden einige bekannte Glykoside verwendet.
An isolierten elektrisch gereizten linken Vorhöfen des Meerschweinchenherzens und an Papillarmuskeln des rechten Ventrikels wurde die positiv inotrope Wirkung dieser Cardenolide verglichen. Außerdem untersuchten wir ihren Einfluß auf die Na^+,K^+-Membran-ATPase des Meerschweinchenherzens und verglichen in Bindungsstudien mit Homogenaten des Meerschweinchenherzens ihre Affinität zu den Bindungsstellen.

B. METHODIK

1. Versuche an isolierten Meerschweinchenvorhöfen

Die Versuche wurden an isolierten, elektrisch gereizten Vorhöfen von Meerschweinchen (300 bis 450 Gramm Körpergewicht) durchgeführt. Die Meerschweinchen wurden durch Nackenschlag getötet und entblutet, die Herzen dem Thorax schnell entnommen und in eine Präparierschale überführt, die auf 31°C vorgewärmte und mit Carbogen durchperlte Krebs-Henseleit-Lösung enthielt. Die linken Vorhöfe wurden abpräpariert, auf einer Platinelektrode fixiert und in einem mit 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung gefüllten Badgefäß bei 31°C suspendiert. Die Badflüssigkeit wurde mit Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) durchströmt. Die elektrische Reizung erfolgte mit Rechteckimpulsen von 1 msec Impulsdauer, einer Frequenz von 1 Hz und einer 2,5-fachen Schwellenstromstärke. Die Registrierung der Kontraktionskraft erfolgte bei einer Vorspannung von 1 Gramm unter isometrischen Bedingungen über Statham-UC2-Zellen. Nach Verstärkung wurden die Signale auf Watanabe- oder Brush-Schreiber sichtbar gemacht.

Die Krebs-Henseleit-Lösung hatte folgende Zusammensetzung:

KCl	4,695	mmol/l	
NaCl	118,04	"	
$MgSO_4$	1,635	"	
$NaHCO_3$	24,877	"	
KH_2PO_4	1,176	"	
Glucose	10,09	"	
$CaCl_2$	1,2	"	(wenn nichts anderes erwähnt wird)

Die Konzentration der herzwirksamen Glykoside wurde in der Badflüssigkeit kumulativ erhöht, dosiert nach dem WL24-System (nach Hackenberg und Bartling, 1959). Die Konzentrationen wurden erhöht, wenn nach der vorhergehenden Konzentration eine gleichmäßige Kontraktionskraftamplitude (steady state) erreicht war.

2. Versuche an Papillarmuskeln des Meerschweinchens

Die Papillarmuskeln wurden aus dem rechten Ventrikel des Herzens entnommen, auf Platinelektroden fixiert und wie die isolierten Vorhöfe in einer Krebs-Henseleit-Lösung suspendiert. Die Calciumkonzentration der Badflüssigkeit betrug 2,4 mmol/l, die Vorspannung 0,5 Gramm.

3. Wirkungsgeschwindigkeit und Haftbarkeit der Cardenolide am Vorhofgewebe

In diesen Versuchen wurde die Glykosidkonzentration, die den maximalen Kontraktionskraftanstieg verursachte, als Einzeldosis dem Badgefäß zugesetzt. Die Zeit, bis sich eine gleichbleibende Amplitude eingestellt hatte, wurde registriert. Nach Erreichen eines "steady states" wurde sechsmal mit Krebs-Henseleit-Lösung ausgewaschen und die Zeit gemessen, in der die Kontraktionskraft zum Ausgangswert abfiel. Diese Versuche wurden zur

Bestimmung zweier Eigenschaften der Cardenolide durchgeführt:

1. der Wirkungsgeschwindigkeit der Cardenolide,
2. ihrer Haftbarkeit am Vorhofgewebe.

4. Isolierung der Na^+,K^+-aktivierten ATPase aus Meerschweinchenherz

Die Na^+,K^+-ATPase wurde nach der Methode von Akera et al. (1969) und Pitts und Schwartz (1975) isoliert.

40 Gramm Meerschweinchenherzgewebe (ungefähr 15 Herzen) wurden im Kühlraum bei 4°C von Fett- und Bindegewebe freipräpariert und mit der Schere zerkleinert. Von einer Lösung, die 0,25 mol Saccharose, 1 mmol Tris Puffer und 1 mmol EDTA enthielt (pH 7,5), wurden 60 ml den Herzen zugegeben und für 30 Sekunden mit einem Messerhomogenisator (Ultra Turrax) homogenisiert. Das Homogenat wurde bis 240 ml mit der gleichen Lösung aufgefüllt, durch 6-fache Gaze gefiltert und für 10 Minuten bei 12000 g = 10800 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 80 ml Lösung suspendiert und für 30 Sekunden homogenisiert. Zu dem entstandenen Homogenat wurden 8 ml 5%ige Natriumdeoxycholat-Lösung tropfenweise zugegeben, 20 Minuten gerührt und weitere 20 Minuten bei 96000 g = 31000 rpm zentrifugiert. Mit einer Pasteur Pipette wurde der Überstand vorsichtig entnommen und

der Niederschlag verworfen. Der Überstand wurde bis 170 ml mit 1 mmol EDTA-Lösung (pH 7,0) aufgefüllt und 90 Minuten bei 96000 g = 31000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 16 ml 1 mmol EDTA-Lösung suspendiert und über Nacht eingefroren. Am folgenden Tag nach dem Auftauen wurden 40 ml 1 mmol/l EDTA-Lösung zugegeben und für 30 Minuten bei 40000 g = 20000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 24 ml 1 mmol/l EDTA-Lösung gelöst und 6 ml NaI-Lösung zugegeben. Nach fünfminütigem Rühren wurde die Lösung mit 1 mmol/l EDTA-Lösung auf 48 ml aufgefüllt und anschließend 25 Minuten bei 96000 g zentrifugiert. In 78 ml (25 mmol/l Imidazol, 1 mmol EDTA) Lösung (pH 7,0) wurde nun der Niederschlag aufgenommen, für 20 Minuten bei 96000 g zentrifugiert, in 8 ml (25 mmol/l Imidazol, 1 mmol EDTA) Lösung in einem Handhomogenisator zerkleinert. Ungefähr 10 ml der Enzymsuspension wurden gegen 300 ml der gleichen Lösung für etwa 18 Stunden unter langsamem Rühren bei 4°C dialysiert und danach bei -20°C eingefroren.

Die Dialyseschläuche (Visking Größe von Klees, Düsseldorf, Flachbreite 25 mm) wurden in ungefähr 10 cm langen Stücken benutzt.

5. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration im Herzhomogenat und in der Enzymsuspension wurde nach einer modifizierten Folin-Methode vorgenommen (Lowry et al., 1951).

Je nach Gehalt an Protein wurden die zu bestimmenden Proben entweder 1:10 (bei der Enzymsuspension) oder 1:20 (beim Herzhomogenat) verdünnt. Zu Beginn wurde eine Standardprotein-Lösung von 100 µg Rinderalbumin in 1 ml Aqua bidest. angesetzt (Abb. 1). Aus der folgenden Stammlösung wurde jeden Tag eine Lösung A frisch angesetzt:

a)	2 % (g/V) Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH	50 ml	} Lösung A
b)	1 % (g/V) Natriumtartrat	1 ml	
c)	0,5 % (g/V) $CuSO_4 \times 5\ H_2O$	1 ml	

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz wurde 1:3 mit Aqua bidest. verdünnt. Die folgenden Ansätze wurden hergestellt:

Röhrchen		Rinderalbumin Standard µl	Aqua bidest. µl	Lösung A ml
1)	Blank	-	350	↑
2)		100	250	
3)	Standard-	150	200	2,5
4)	reihe	200	150	
5)		250	100	↓
6)	Homogenat (1:20)	-	250	
7)	Enzym (1:10)	-	250	

Die Verdünnung der Proben diente dazu, die störenden Effekte von suspendierten Lipiden zu eliminieren.

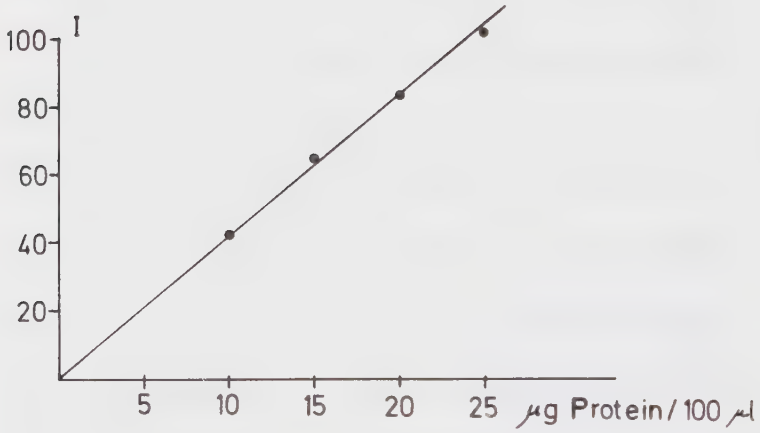
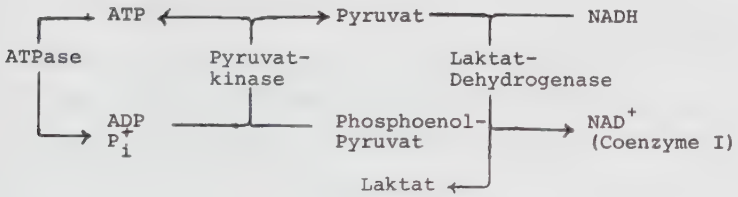


Abb. 1: Eichkurve für die Proteinbestimmung

6. Aktivitätsbestimmung durch gekoppelte Ein-Substrat-Reaktion

Die Aktivität der Meerschweinchenherz-ATPase wurde nach der Methode von Pullmann et al. (1960) und Fritz und Hamrick (1966) bestimmt. Die Methode beruht auf folgendem Prinzip:



Die Messungen wurden in einem Zeiss Spektrophotometer PM 7 mit Küvettenautomatik durchgeführt.

Jede Küvette enthielt 2,5 ml Puffer, der die folgende Zusammensetzung hatte: 3 mmol/l ATP, 5 mmol/l Mg^{2+}, 100 mmol/l Na^+, 10 mmol/l K^+, 50 mmol/l Imidazol-HCl-Puffer (pH 7,4), 0,25 mmol/l NADH, 0,35 mmol/l Phosphoenolpyruvat, ungefähr 5 Einheiten Pyruvat-kinase, 4 Einheiten Laktat-dehydrogenase und 100 µl Enzym-Suspension. Das Reaktionsmedium wurde zuerst ohne ATP und NADH für 5 Minuten bei 37 °C präinkubiert, dann wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP und NADH gestartet. Die Lichtabsorptionsabnahme wurde bei 340 nm und 37 °C gemessen. Da die beiden

Reaktionen ($NADH \longrightarrow NAD^+$ und $ATP \longrightarrow ADP+P_i$) parallel verlaufen, besteht ein direktes Verhältnis zwischen dem oxidierten NADH (NAD^+) und dem freigesetzten Phosphat. So entsprechen die µmol oxidierten NADH's direkt den µmol freigesetzten anorganischen Phosphaten.

Zur Bestimmung der Mg^{2+}-ATPase-Aktivität wurde das Reaktionsmedium mit 1 mmol Ouabain präinkubiert. Diese Konzentration genügt, um die Na^+,K^+-ATPase Aktivität vollkommen zu hemmen.
Die Na^+,K^+-ATPase Aktivität entspricht der Differenz zwischen der Gesamtaktivität und der Mg^{2+}-ATPase Aktivität.

$$\text{Aktivität} = \frac{[NADH]\ \mu mol}{Abs.} \cdot \frac{\Delta\ Absorption/min}{Protein \cdot mg}$$

$$= [\mu mol\ P_i/(mg\ Protein \cdot min)]$$

Δ Absorption = Absorp. in Abwesenheit - Absorp. in Anwesenheit von g-Strophanthin

Abs. = 1,557 = NADH Absorptionskoeffizient

7. Bestimmung der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase

(Aktivitätsbestimmung in Anwesenheit von Herzglykosiden)

Es wurde die Na^+,K^+-ATPase Aktivität in Anwesenheit von verschiedenen Glykosidkonzentrationen gemessen. Die untersuchten Glykoside waren außer Digitoxin alle wasserlöslich. Digitoxin wurde in einem Äthanol-Wasser-Gemisch gelöst. Die Wirkung des verdünnten Äthanols wurde durch Leerversuche ausgetestet. Hieraus ergab sich eine Beeinflussung der Aktivität durch die Lösungsmittel, die bei höheren Digitoxinlösungen angewendet werden mußten. Die entsprechenden Meßwerte wurden korrigiert.

Jede Küvette hatte 2,5 ml Endvolumen. Das Reaktionsmedium enthielt die oben angeführte Zusammensetzung und eine bestimmte Glykosidkonzentration. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C wurde NADH und ATP den Küvetten zugesetzt und die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase gemessen. Die Daten wurden als Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt.
Die Reversibilität der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase wurde nach dem folgenden Schema durchgeführt (Peters et al., 1974, und Fricke et al., 1981):

			Kontrolle
(1)	(2)	(3)	(4)
Medium	Medium	Medium	Medium
Enzym	Enzym	Enzym	Enzym
Cardenolid	Cardenolid	Cardenolid 1:10	-

Nach einer fünfminütigen Präinkubation bei 37 °C wurde ATP und NADH zugegeben und die Aktivität gemessen. Dann wurden die Ansätze so verdünnt, daß man die folgenden Konzentrationen erhielt:

(1)	(2)	(3)	(4)
Medium	Medium	Medium	Medium
Enzym 1/10	Enzym 1/10	Enzym 1/10	Enzym 1/10
Cardenolid	Cardenolid 1:10	Cardenolid 1:10	-

Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden wieder ATP und NADH zugegeben und die Aktivität gemessen. Die prozentualen Hemmungen in den Ansätzen (1), (2) und (3) wurden miteinander verglichen. Die Neigung der Hemmungskurve in (2) zu (3) wurde als % Reversibilität ausgedrückt.

Die Endkonzentration des Mediums an Pyruvat-Kinase, Laktat-Dehydrogenase, Phosphoenolpyruvat, Na^+-, K^+- und Mg^{2+}-Ionen, ATP und NADH waren gleich groß, wie in dem schon beschriebenen gekoppelten Assay und wurden während des Versuches konstant gehalten.

8. ^{3}H Ouabain-Bindungsstudien

Die Bindungsstudien wurden in Anlehnung an die Methode von Yamamoto et al. (1981) durchgeführt. Das Ventrikelgewebe wurde bei 0 - 4°C in einer Lösung von 1 mmol/l EDTA und 10 mmol/l Tris-HCl (pH 7,5) homogenisiert; die Konzentration betrug 30 mg Gewebe/ml Puffer.

a) Zeitabhängige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain

Diese Bestimmung diente dazu, die Zeit der Bindung bis zum Gleichgewicht zwischen radioaktivmarkiertem und kaltem Glykosid zu bestimmen. Drei Proben wurden jeweils angesetzt: Blank, Kontrolle und Test. Alle drei enthielten Tris-HCl 50 mmol/l, NaCl 200 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l und ^{3}H-Ouabain 10 nmol/l. Die Kontroll- und Testproben enthielten zusätzlich 5 mmol/l Tris ATP. Das kalte Glykosid befand sich nur in den Testproben. Die drei Proben wurden auf das gleiche Volumen mit Aqua bidest. aufgefüllt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 37°C wurde das Homogenat zugesetzt. Das Endvolumen betrug 10 ml. Alle 5 oder 10 Minuten wurde 1 ml von jeder Probe abgezogen und die Reaktion mit 4 ml Waschlösung (unmarkiertes Ouabain-Tris-HCl) gestoppt. Gebundenes und freies ^{3}H-Ouabain wurde durch Filtration durch einen Millipore Nitrocellulose-Filter (Typ AA, Porengröße 0,8 µm) voneinander getrennt (Ku et al., 1974). Der Filter wurde mit 1 ml Äthylenglykol-mono-

methylester gelöst und nach Zugabe von 7,5 ml Szintillationsflüssigkeit die Radioaktivität im Beckman Counter gemessen.

b) Konzentrationsabhängige Verdrängung

Die Blank- und Kontrollproben hatten die gleiche Zusammensetzung wie bei der zeitabhängigen Bestimmung. Die Testproben enthielten 0,01 bis 1 µmol Ouabain oder ähnliche Konzentrationen von anderen unmarkierten Glykosiden. Die Proben wurden bei 37 °C für die Zeit inkubiert, in der sich ein Gleichgewicht zwischen der Bindung von ^{3}H-Ouabain und dem betreffenden unmarkierten Glykosid einstellte. Diese Zeit wurde bei den Versuchen der zeitabhängigen Verdrängung bestimmt. Die Daten wurden durch einen Scatchard plot dargestellt, um den K_{Dx}-Wert und die Anzahl der Glykosidbindungsstellen zu bestimmen. K_{Dx} entspricht der Konzentration des unmarkierten Glykosids, die eine 50%ige Verdrängung verursachte. Die Verdrängung von ^{3}H-Ouabain durch andere unmarkierte Glykoside als Ouabain wurde in Konzentrationswirkungskurven dargestellt. Die K_{Dx}-Werte für die verschiedenen Glykoside konnte man nicht direkt (Scatchard plot) bestimmen, weil die dazugehörigen radioaktiv markierten Analoge nicht vorhanden waren. Deswegen wurden die K_{Dx}-Werte in Anlehnung an die indirekte Methode von Erdmann und Schoner (1974) ausgerechnet. Diese Methode beruht auf der mathematischen Ableitung folgender Formel:

$$[R_x] = [R_t] - B_x - \frac{B_x \cdot F_o}{F_x \cdot B_o} \quad ([R_t] - B_o)$$

$$K_{Dx} = \frac{([R_t] - B_x - [R_x]) \cdot ([X_t] - [R_x])}{[R_x]}$$

R_x = Konzentration der von dem unmarkierten Glykosid besetzten Rezeptoren

R_t = Gesamte Rezeptorkonzentration = B_{max} (von Scatchard plot entnommen)

B_o und B_x = Konzentration der mit ^{3}H-Ouabain besetzten Rezeptoren in Abwesenheit (B_o) und Anwesenheit (B_x) des unmarkierten Glykosids

F_o und F_x = Freies ^{3}H-Ouabain in Abwesenheit (F_o) und Anwesenheit (F_x) des unmarkierten Glykosids

X_t = Molare Konzentration des unmarkierten Glykosids im Reaktionsmedium

K_{Dx} = Dissoziationskonstante = Konzentration, die eine 50%ige Verdrängung verursacht.

9. Statistische Methode

Die Glykosidkonzentration, die einen 50%igen Anstieg der Kontraktionskraft linker Vorhöfe (EC_{50}) oder eine 50%ige Hemmung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität (I_{50}) bewirkte, wurde durch eine Kurvenanpassung der Konzentrations-Wirkungskurven nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate ermittelt (Hafner et al., 1977). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert $\pm$ mittlerer Fehler des Mittelwertes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$) ausgedrückt.
Regression und Korrelationskoeffizient wurden mit einem Texas Rechner SR-51 berechnet.

10. Verwendete Chemikalien und Glykoside

a) Chemikalien

- Äthanol absolut zur Analyse
- Äthylendinitrilotetraessigsäure, EDTA, Titriplex II
- Äthylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz (dihydrat), EDTA Na_2, Titriplex III
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz
- Natriumdesoxycholat
- Saccharose
- Borsäure, krist. zur Analyse
- $MgSO_4$, KCl, NaCl, $NaHCO_3$, KH_2PO_4, $CaCl_2$, Glucose, NaI und KI

(Merck, Darmstadt)

- Adenosin-5'-triphosphat, krist. Dinatriumsalz
- ß-Nikotinamid-adenosin-dinucleotid, reduziert, Dinatriumsalz, NADH
- Phosphoenolpyruvat, Tricyclohexylammoniumsalz, PEP
- Pyruvat-Kinase/Laktat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel

(Boehringer Mannheim GmbH.)

- Rinderalbumin, Lyophilisat

(Serva Feinbiochemica, Heidelberg)

- Unisolve

(Werner Zinsser, Frankfurt)

b) Glykoside

- Dihydroouabain
- Digoxigeninmonodigitoxosid
- Digitoxigeninmonodigitoxosid
- k-Strophanthidin
- k-Strophanthosid

(Boehringer Mannheim GmbH.)

- Digoxin
- Digitoxin
- g-Strophanthin (Ouabain)

(Merck, Darmstadt)

- ^{3}H-Ouabain

(NEN, Dreieich)

- 3-α-Methyldigitoxigenin-ß-glucosid (AL 107)

(Beiersdorf AG., Hamburg)

- Strophanthidol
- Convallatoxol
- Cymarin
- Convallatoxin
- Nikotinyl-k-Strophanthidin (NS) Gö 2616
- Nikotinyl-k-Strophanthidin Methoiodid (NSM) Gö 2485
- Methylconvallatoxin Gö 3333
- Convallatoxinacetonid (CAc) Gö 2487
- Convallatoxolacetonidborsäureester (CAcBE) Gö 2571
- Butyryl-Convallatoxinacetonid (BCAc) Gö 2800

(Gödecke AG., Freiburg) *)

---

*) Die semisynthetischen Cardenolide der Firma Gödecke wurden uns freundlicherweise von Herrn Dr. Satzinger zur Verfügung gestellt. Die chemische Konstitution der untersuchten Cardenolide ist in den Abbildungen 2 bis 4 dargestellt.

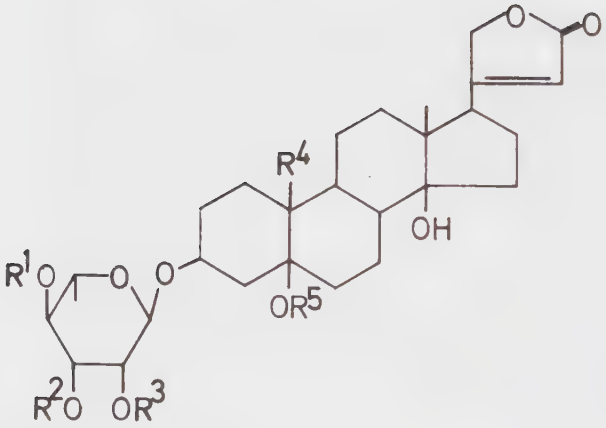


Abb. 2:

Glykosid	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
Convallatoxin	H	H	H	-CHO	H
Methylconvallatoxin Gö 3333	H	$-CH_3$	H	-CHO	H
Convallatoxinacetonid (CAc) Gö 2487	H	$-C(CH_3)_2-$		-CHO	H
Butyryl-Convallatoxinacetonid (BCAc) Gö 2800	$CH_3(CH_2)_2CO-$	$-C(CH_3)_2-$		-CHO	H
Convallatoxolacetonidborsäureester (CAcBE) Gö 2571	H	$-C(CH_3)_2-$		$-CH_2-O-B-$ / OH	

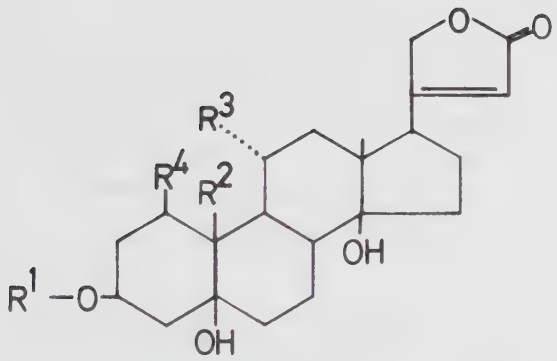
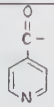
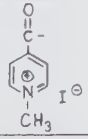


Abb. 3:

Glykosid	R_1	R_2	R_3	R_4	
k-Strophanthidin	H	-CHO	H	H	
Strophanthidol	H	$-CH_2OH$	H	H	
Cymarin	Cymarose	-CHO	H	H	
k-Strophanthosid	1 Cymarose +2 Glucose	-CHO	H	H	
Ouabain (g-Strophanthin)	Rhamnose	$-CH_2OH$	OH	OH	
Nikotinyl-k-Strophanthidin (NS) Gö 2616		-CHO	H	H	
Nikotinyl-k-Strophanthidin Methoiodid (NSM) Gö 2485		-CHO	H	H	
Dihydroouabain	Rhamnose	$-CH_2OH$	OH	OH	gesättigter Laktonring

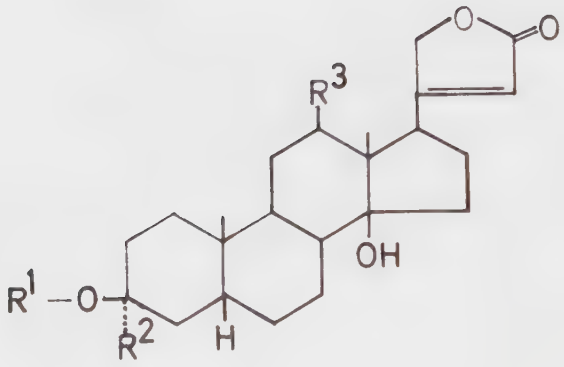


Abb. 4:

Glykosid	R_1	R_2	R_3
Digitoxin	3 x Digitoxose	H	H
Digoxin	3 x Digitoxose	H	OH
AL 107	Glucose	$-CH_3$	H
Digitoxigenin-monodigitoxosid	Digitoxose	H	H
Digoxigenin-monodigitoxosid	Digitoxose	H	OH

C. Ergebnisse

1. Die positiv inotrope Wirkung der Cardenolide am isolierten Vorhof des Meerschweinchens

Wie aus den Konzentrations-Wirkungskurven der Abbildung 5 hervorgeht, verursachen alle verwendeten Cardenolide an linken elektrisch gereizten Vorhofpräparaten einen Anstieg der Kontraktionskraft. Ihre Wirkung unterscheidet sich jedoch unter 4 Gesichtspunkten:

1.) Die Affinität der Cardenolide gemessen an der Konzentration, die positiv inotrop wirkt, z.B. die eine 50%ige Zunahme der Kontraktionskraft verursacht (EC_{50}).

2.) Die intrinsische Aktivität, d.h. eine mehr oder weniger starke maximal erreichbare Steigerung der Kontraktionskraft.

3.) Die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven.

4.) Das prozentuale Verhältnis zwischen derjenigen Konzentration, die eine 50%ige Zunahme der Kontraktionskraft (EC_{50}) und derjenigen, die eine maximale Wirkung verursacht (EC_{max}), d.h. $\frac{EC_{50}}{EC_{max}} \times 100$

Punkt 3 und 4 geben möglicherweise einen Hinweis auf die therapeutische Breite der Cardenolide.

In dieser Versuchsreihe betrug die Anzahl der Versuche für jedes Cardenolid mindestens n = 6.

a) Vergleich der Affinität und der intrinsischen Aktivität

Die Affinität und intrinsische Aktivität der einzelnen Cardenolide sind, wie Abbildung 5 zeigt, voneinander verschieden.

Zur Errechnung der Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven und der EC_{50} als Maß der Affinität wurden die Kurven nach dem Logit Programm mit Hilfe eines Computers aufgetragen (Abb. 6-8). Die von uns untersuchten semisynthetischen Cardenolide haben alle eine positiv inotrope Wirkung, die mit der Wirkung anderer Herzglykoside vergleichbar ist.

In Tabelle 1 sind die EC_{50}-Werte in µmol/l der einzelnen Cardenolide in der Reihenfolge ihrer Affinität dargestellt. Danach hat k-Strophanthidin die niedrigste und CAcBE die höchste Affinität. Mit anderen Worten ist CAcBE gemessen an der für den inotropen Effekt notwendigen Konzentration etwa 305 mal wirksamer als k-Strophanthidin.

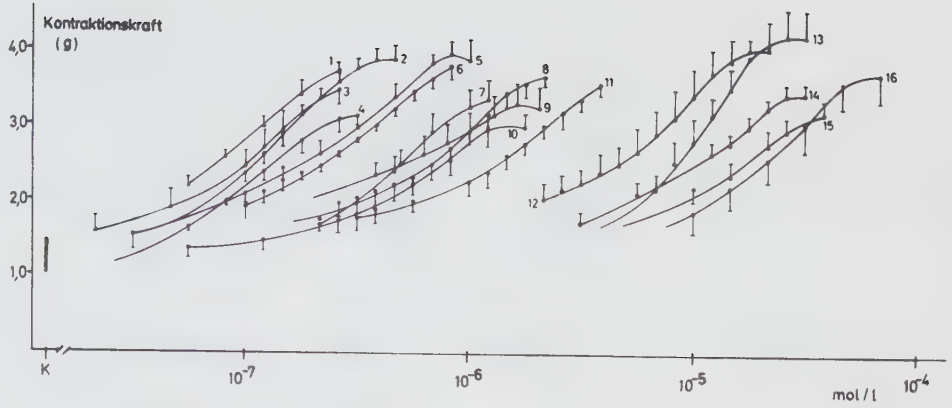


Abb. 5: Konzentrations-Wirkungskurven der untersuchten Cardenolide am isolierten elektrisch gereizten Vorhofpräparat

1 Digitoxin
2 Convallatoxin
3 CAcBE
4 Digitoxigeninmono-digitoxosid
5 CAc
6 Methylconvallatoxin
7 k-Strophanthosid
8 Cymarin
9 BCAc
10 Digoxigeninmono-digitoxosid
11 Strophanthidol
12 NSM
13 Dihydroouabain
14 AL 107
15 NS
16 k-Strophanthidin

K = Kontrolle

Abb. 6 bis 8:

Konzentrations-Wirkungskurven der Cardenolide aus Abbildung 5 nach dem Logit-Programm

100 % = maximale Zunahme der Kontraktionskraft durch die einzelnen Cardenolide

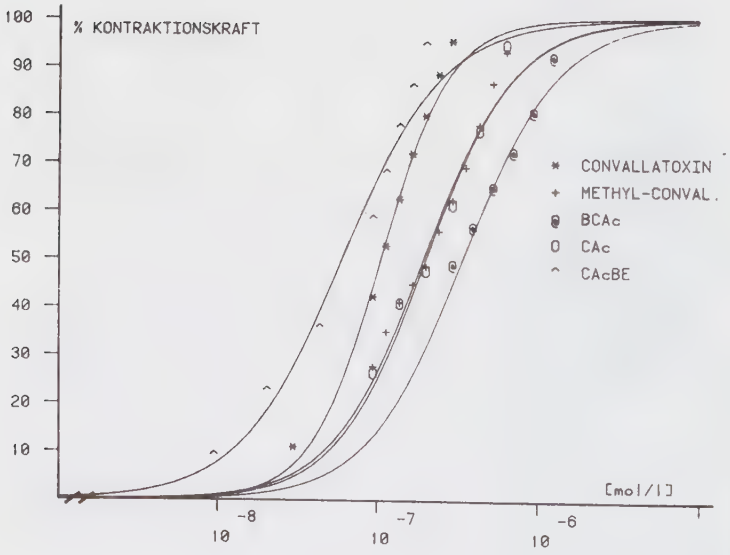


Abb. 6:

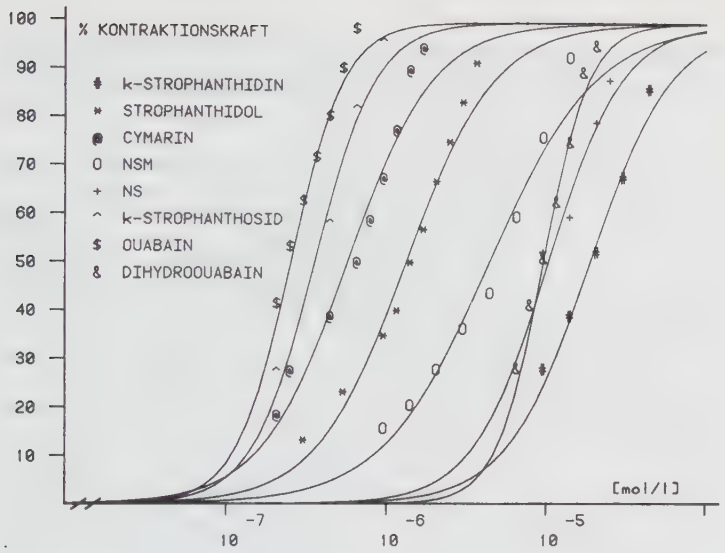

% KONTRAKTIONSKRAFT
k-STROPHANTHIDIN
STROPHANTHIDOL
CYMARIN
NSM
NS
k-STROPHANTHOSID
OUABAIN
DIHYDROOUABAIN
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
[mol/l]
10 -7
10 -6
10 -5

Abb. 7

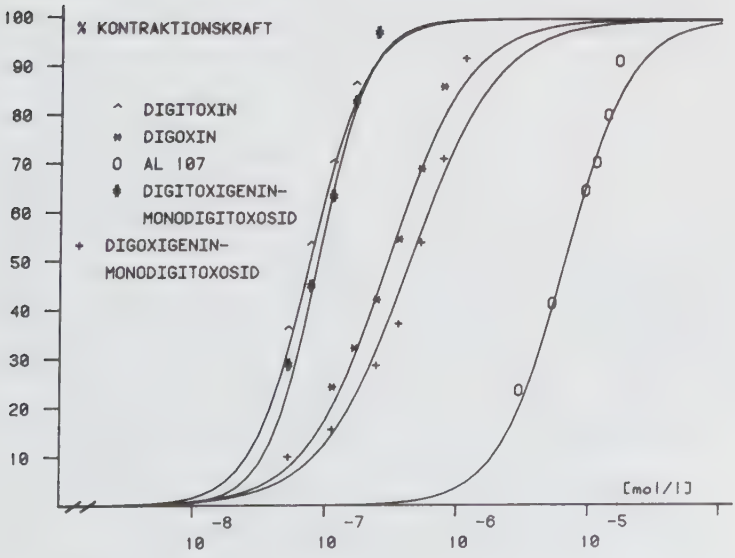

% KONTRAKTIONSKRAFT
DIGITOXIN
DIGOXIN
AL 107
DIGITOXIGENIN-MONODIGITOXOSID
DIGOXIGENIN-MONODIGITOXOSID
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
[mol/l]
10 -8
10 -7
10 -6
10 -5

Abb. 8

Tabelle 1: Einfluß der Cardenolide auf die Kontraktionskraft linker elektrisch gereizter Meerschweinchenvorhöfe: ihre intrinsische Aktivität und Affinität

GLYKOSID	intrinsische Aktivität		Affinität	
	max. Zunahme der Kontraktionskraft in Gramm	bezogen auf k-Strophanthidin	EC_{50} µmol/l	EC_{50} bezogen auf CAcBE
k-Strophanthidin	2,88	1	18,6	305
NS	2,04	0,71	10,2	167
Dihydro-ouabain	2,89	1	9,51	156
AL 107	2,24	0,78	6,56	108
NSM	2,71	0,94	4,37	71,6
Strophanthidol	2,31	0,80	1,31	21,5
Cymarin	2,40	0,83	0,566	9,27
Digoxigenin-monodigitoxosid	1,98	0,68	0,535	8,77
k-Strophanthosid	2,31	0,80	0,352	5,77
BCAc	1,93	0,67	0,347	5,68
Digoxin	2,13	0,74	0,312	5,11
Ouabain	2,21	0,77	0,250	4,09
CAc	2,56	0,89	0,202	3,31
Methyl-convallatoxin	2,64	0,92	0,197	3,22
Convallatoxin	2,66	0,92	0,106	1,73
Digitoxigenin-monodigitoxosid	2,11	0,73	0,087	1,43
Digitoxin	2,43	0,84	0,076	1,25
CAcBE	2,52	0,88	0,061	1,00

Die Reihenfolge der intrinsischen Aktivität ist nicht identisch mit der Reihenfolge der Affinität.Wie aus Tab. 1 hervorgeht, besitzen Dihydroouabain und k-Strophanthidin die höchste und BCAc die niedrigste intrinsische Aktivität. Das quaternäre NSM hat die höchste intrinsische Aktivität unter den neuen semisynthetischen Cardenoliden, die vergleichbar mit der des k-Strophanthidin und Dihydroouabain ist. Das nicht quaternäre Nikotinyl-k-Strophanthidin (NS) hat eine schwächere Aktivität als NSM. Die beiden Substanzen unterscheiden sich auch in der Affinität, NSM ist etwa doppelt so wirksam wie NS.

In der Convallatoxin-Gruppe besitzt CAcBE die höchste Affinität mit einer EC_{50} = 0,061 µmol/l; sie ist zugleich auch die Substanz mit der höchsten Affinität im Vergleich zu allen anderen untersuchten Cardenoliden. Dann folgen Convallatoxin, Methylconvallatoxin und CAc mit etwas niedrigeren Affinitäten (EC_{50}-Werte: 0,106; 0,197 und 0,202 µmol/l). In der intrinsischen Aktivität unterscheiden sich diese Convallatoxin-Derivate dagegen wenig voneinander.

k-Strophanthosid und BCAc haben fast die gleiche Affinität mit einer EC_{50} = 0,352 bzw. 0,347 µmol/l, und bei etwas höherer Konzentration liegt die EC_{50} von Cymarin (0,566 µmol/l).

In der Digitalis-Gruppe hat Digitoxin die höchste Affinitat mit einer EC_{50} = 0,076 µmol/l, dann kommt Digitoxigeninmonodigitoxosid, Digoxin, Digoxigeninmonodigitoxosid und AL 107 mit der niedrigsten Affinität (EC_{50}=6,65 µmol/l).

Im Unterschied zur Affinität unterscheiden sich die Glykoside der Digitalis-Gruppe in ihrer intrinsischen Aktivität nur wenig voneinander.

b) Hinweis auf die therapeutische Breite

Die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven und das Verhältnis von EC_{50}/EC_{max} können als Hinweis auf die therapeutische Breite der Cardenolide verwendet werden, da bei Überschreiten der EC_{max} das Auftreten von Arrhythmien oder eine Abnahme der Kontraktionskraft den Beginn toxischer Wirkungen darstellt. Je flacher die Konzentrations-Wirkungskurve und je kleiner das Verhältnis von EC_{50} zu EC_{max} ist, desto größer ist vermutlich die therapeutische Breite des Glykosids. In Tabelle 2 sind die Glykoside nach zunehmender Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve geordnet. Danach hat NSM die flachste Kurve und den niedrigsten EC_{50}/EC_{max}-Wert, was auf eine große therapeutische Breite hinweist. Dihydroouabain hat einen sehr steilen Kurvenverlauf und den höchsten EC_{50}/EC_{max}-Wert und danach die geringste therapeutische Breite.

Tabelle 2: Die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven errechnet mit Hilfe des Logit Programms und das prozentuale Verhältnis der EC_{50} zu EC_{max} der untersuchten Cardenolide

GLYKOSID	Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven	$\frac{ED_{50}}{ED_{max}}$ x 100
NSM	1,31 ± 0,05 (1,00)	20 (1,00)
Digoxigenin-monodigitoxosid	1,32 ± 0,05 (1,01)	24 (1,20)
CAcBE	1,37 ± 0,05 (1,05)	23 (1,15)
BCAc	1,45 ± 0,10 (1,11)	20 (1,00)
Methyl-convallatoxin	1,51 ± 0,06 (1,15)	24 (1,20)
CAc	1,55 ± 0,08 (1,18)	24 (1,20)
Strophanthidol	1,57 ± 0,05 (1,20)	28 (1,40)
Cymarin	1,63 ± 0,06 (1,24)	26 (1,30)
k-Strophanthidin	1,70 ± 0,09 (1,30)	27 (1,35)
AL 107	1,76 ± 0,08 (1,34)	28 (1,40)
NS	1,89 ± 0,15 (1,44)	27 (1,35)
Digoxin	1,91 ± 0,08 (1,46)	26 (1,30)
Convallatoxin	2,01 ± 0,07 (1,53)	28 (1,40)
Digitoxin	2,03 ± 0,13 (1,55)	29 (1,45)
k-Strophanthosid	2,28 ± 0,11 (1,74)	29 (1,45)
Digitoxigenin-monodigitoxosid	2,32 ± 0,12 (1,77)	28 (1,40)
Ouabain	2,60 ± 0,14 (1,98)	30 (1,50)
Dihydroouabain	3,06 - 0,13 (2,34)	36 (1,80)

( ) = Relation bezogen auf NSM = 1

2. Einfluß der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Wirkung der Cardenolide

Die positiv inotrope Wirkung der Glykoside ist bekanntlich sehr stark von der extrazellulären Calciumkonzentration abhängig (Dudek und Mantel, 1979; Reiter, 1963; Dahmen und Greeff, 1981). Deshalb wurden Konzentrations-Wirkungskurven bei verschiedener Calciumkonzentration aufgenommen. Bei jeder extrazellulären Calciumkonzentration betrug die Anzahl der Versuche n = 4 - 6. Abbildungen 9 bis 16 zeigen Konzentrations-Wirkungskurven von Digitoxin, Digoxin, AL 107, Ouabain, Dihydroouabain, NSM, CAc, BCAc, CAcBE bei extrazellulären Calciumkonzentrationen von 0,6; 1,2 und 2,4 mmol/l. In Tabelle 2 sind die Werte zusammengefaßt.

Es zeigt sich, daß die positiv inotrope Wirkung aller Cardenolide mit Erniedrigung der extrazellulären Calciumkonzentration abnimmt. Auffallend ist allerdings, daß CAc, Dihydroouabain und AL 107 relativ unempfindlich sind gegen den extrazellulären Calciumentzug und noch bei 0,6 mmol/l Calciumkonzentration in der Badflüssigkeit eine maximale Kontraktionskraft über 3 Gramm erreicht wird.

Die unterschiedliche Glykosidwirkung bei verschiedenen Calciumkonzentrationen äußert sich nicht nur in einer Änderung der Kontraktionskraft sondern auch in der Konzentration der Glykoside, die für einen maximalen Anstieg notwendig ist. Diese Werte sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß mit abnehmender Calciumkonzentration höhere Glykosidkonzentrationen benötigt werden, um einen maximalen

Anstieg der Kontraktionskraft herbeizuführen.
Es ist auffallend, daß auch hier CAc, Dihydroouabain und AL 107 eine Ausnahme bilden und der Abstand der Cardenolidkonzentrationen geringer ist als bei den anderen Substanzen.

Dies geht auch aus Abbildung 18 hervor, in der der maximale Anstieg der Kontraktionskraft unter dem Einfluß der Cardenolide bei verschiedener Calciumkonzentration in Säulen dargestellt ist.

Abb. 9 - 16: Einfluß der extrazellulären Calciumkonzentration (0,6; 1,2 und 2,4 mmol/l) auf die Wirkung der untersuchten Cardenolide an isolierten linken Meerschweinchenvorhöfen. K = Kontrolle.

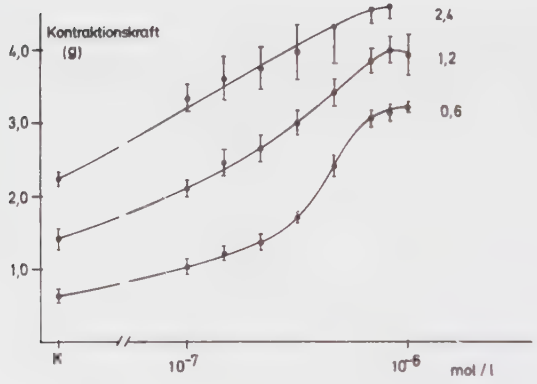


Abb. 9: für CAc (Gö 2487)

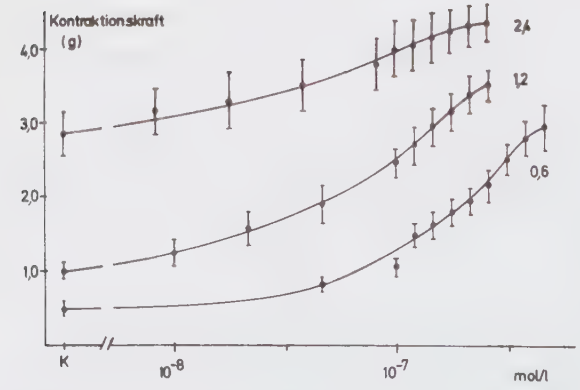


Abb. 10: für CAcBE (Gö 2571)

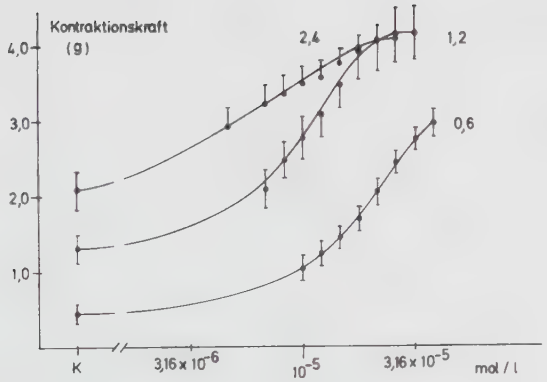


Abb. 11: für Dihydroouabain

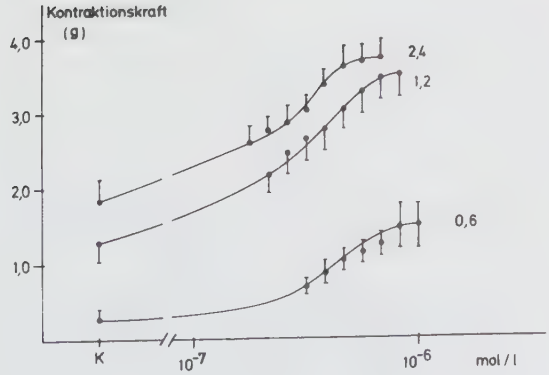


Abb. 12: für Ouabain

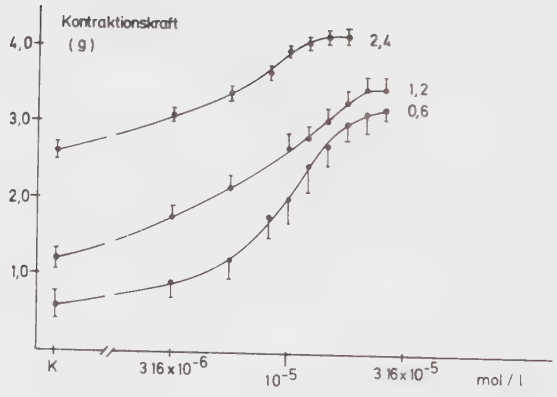


Abb. 13: für AL 107

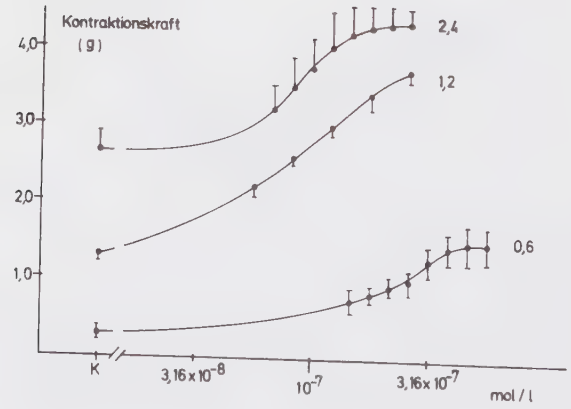


Abb. 14: für Digitoxin

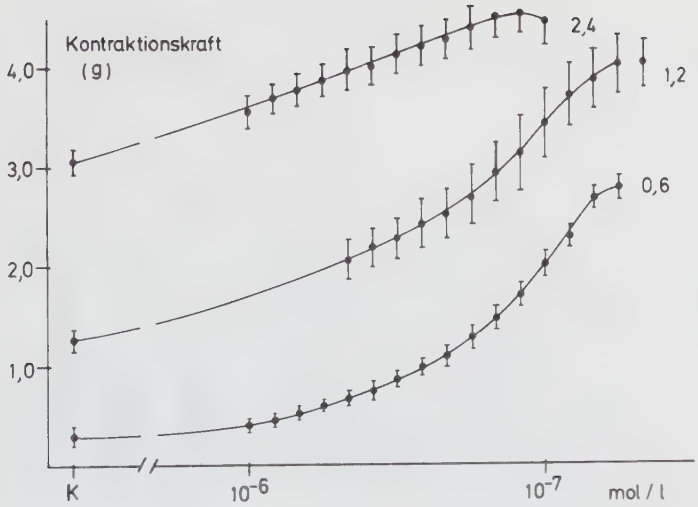


Abb. 15: für NSM (Gö 2485)

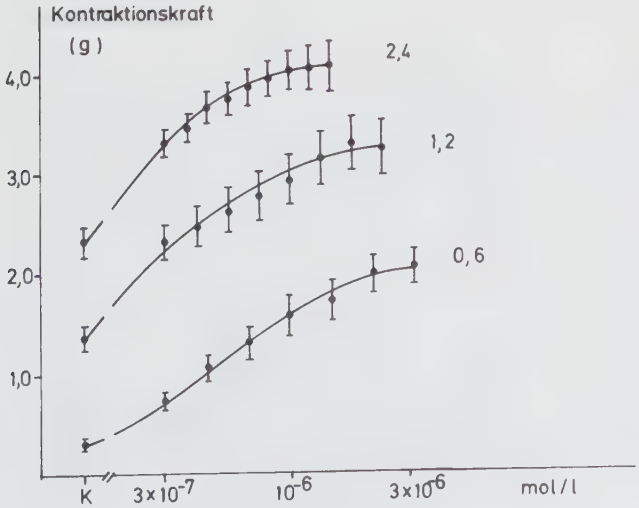


Abb. 16: für BCAc (Gö 2800)

Tabelle 3: Einfluß der extrazellulären Ca^{2+}-Konzentration auf die positiv inotrope Wirkung der Cardenolide

GLYKOSID	Zunahme der Kontraktionskraft der Vorhöfe bei					
	0,6 mmol/l Ca^{2+}		1,2 mmol/l Ca^{2+}		2,4 mmol/l Ca^{2+}	
	Δ [g]	Maximum [g]	Δ [g]	Maximum [g]	Δ [g]	Maximum [g]
Digitoxin	1,24	1,51	2,43	3,75	1,71	4,35
AL 107	2,79	3,37	2,24	3,45	1,51	4,11
Ouabain	1,30	1,51	2,21	3,53	1,90	3,76
Dihydroouabain	2,58	3,01	2,89	4,24	2,02	4,12
CAc	2,58	3,21	2,56	3,97	2,33	4,57
BCAc	1,74	2,04	1,93	3,29	1,77	4,08
CAcBE	2,45	2,94	2,52	3,51	1,50	4,36
NSM	2,55	2,79	2,71	3,90	1,50	4,57

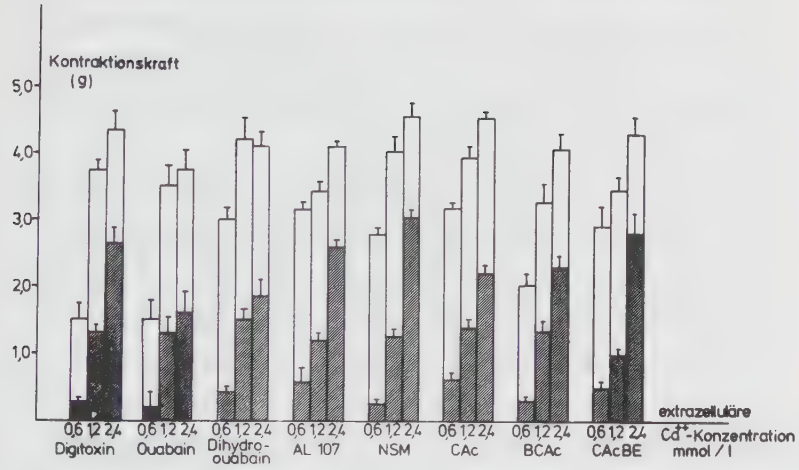


Abb. 18: Maximale Steigerung der Kontraktionskraft durch die untersuchten Cardenolide bei den drei äußeren Calciumkonzentrationen 0,6; 1,2 und 2,4 mmol/l.

▨ Ausgangsamplitude

▭ maximale Wirkung der Cardenolide

3. Versuche mit dem Borsäureester

Da der Borsäureester (CAcBE) in der Badflüssigkeit möglicherweise gespalten werden könnte und dabei freie Borsäure entsteht, wurden Konzentrations-Wirkungskurven mit äquimolaren Gemischen von Convallatoxol, CAc bzw. k-Strophanthosid mit Borsäure aufgenommen.

Wie Abbildung 19 zeigt, wird die Wirkung dieser Glykoside durch die Anwesenheit von Borsäure nicht verstärkt: die Konzentrations-Wirkungskurven der Glykoside und ihrer äquimolaren Gemische mit Borsäure stimmen überein.

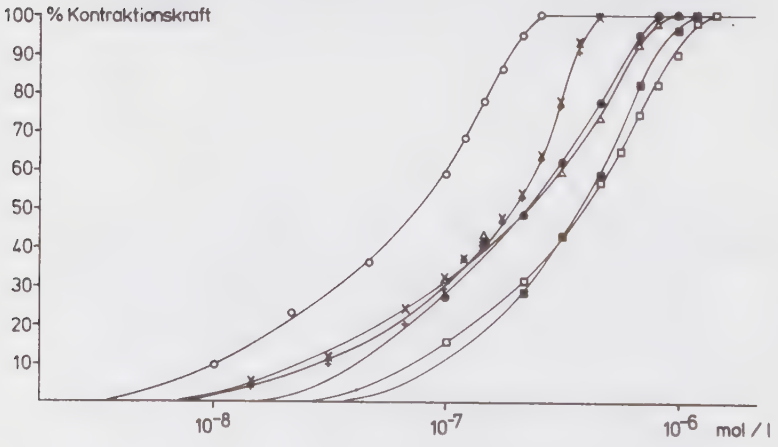


Abb. 19: Konzentrations-Wirkungskurven von CAcBE O, CAc ●, CAc+Borsäure (äquimolar) Δ, k-Strophanthosid ■, k-Strophanthosid+Borsäure (äquimolar) □, Convallatoxol X, Convallatoxol+Borsäure (äquimolar) +

4. Versuche an Meerschweinchenpapillarmuskeln

Zum Vergleich der Cardenolidwirkung am Vorhof- und am Ventrikelgewebe wurden für einige Glykoside Konzentrations-Wirkungskurven am isolierten Papillarmuskel erstellt (Abb. 20). Die Anzahl der Versuche für jedes Cardenolid betrug n = 4. Bei allen Glykosiden außer CAc und CAcBE sind die Kurven am Papillarmuskel flacher als die an linken Vorhöfen. Der maximale Anstieg der Kontraktionskraft erfolgt erst bei höheren Konzentrationen und betrug höchstens 30 % des maximalen Anstiegs an Vorhöfen. Auch die EC_{50}-Werte sind in dieser Versuchsreihe höher als bei den Vorhöfen. Diese Versuche zeigen, daß das Vorhofgewebe empfindlicher gegenüber Herzglykosiden ist als Ventrikelgewebe. Tabelle 5 faßt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zusammen.

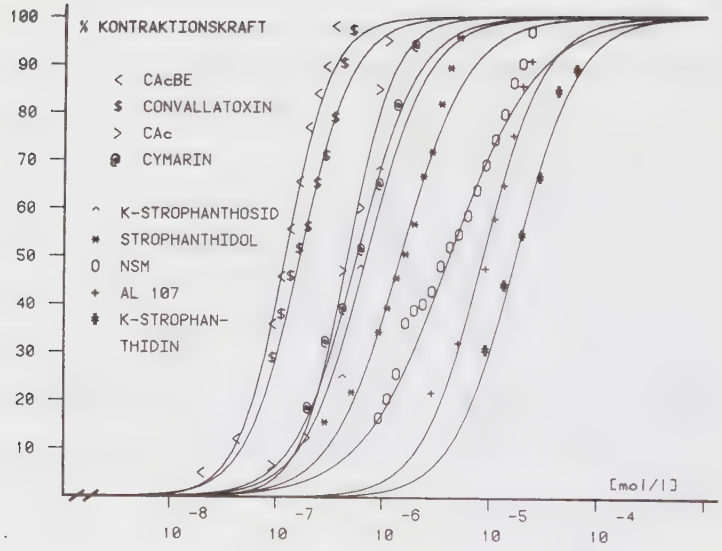


Abb. 20: Konzentrations-Wirkungskurven einiger Cardenolide an Papillarmuskeln von Meerschweinchen nach dem Logit-Programm
100 % = maximale Zunahme der Kontraktionskraft, durch die einzelnen Cardenolide
extrazelluläre Calciumkonzentration = 2,4 mmol/l

Tabelle 5: Vergleich der Wirksamkeit einiger Herzglykoside an Papillarmuskeln des Herzens von Meerschweinchen (n = 5 - 6).

GLYKOSID	Papillarmuskel (PM)		Vorhof (VH)
	Δ_{max} [g]	EC_{50} µmol	EC_{50} µmol
CAcBE	0,71	0,120±0,002	0,061
Convallatoxin	0,88	0,170±0,003	0,11
CAc	0,69	0,47 ±0,01	0,202
Cymarin	0,74	0,57 ±0,02	0,57
k-Strophanthosid	0,44	0,71 ±0,03	0,352
Strophanthidol	0,80	1,48 ±0,03	1,31
NSM	0,76	4,24 ±0,10	4,37
AL 107	0,58	8,69 ±0,22	6,56
k-Strophanthidin	0,67	17,50 ±0,52	18,6

Δ_{max} = maximale Zunahme der Kontraktionskraft unter dem Einfluß der einzelnen Cardenolide

EC_{50} = Cardenolid-Konzentration, die eine halbmaximale Steigerung der Kontraktionskraft bewirkt.

5. Vergleich der Wirkungs- und Abklinggeschwindigkeit der Cardenolide am Vorhof des Meerschweinchens

In dieser Versuchsreihe wurden diejenigen Konzentrationen, die in Konzentrations-Wirkungskurven zu einem maximalen Anstieg der Kontraktionskraft führten, mit einer Einzelgabe der Badflüssigkeit zugesetzt. Dabei bestimmten wir die Wirkungsgeschwindigkeit, d.h., die Zeit bis zum Eintritt einer gleichmäßigen maximalen Kontraktionskraftamplitude (steady state) und die Haftbarkeit des Glykosids am Gewebe, d.h., die Zeit in der die Wirkung nach Badwechsel abgeklungen war. In Abbildung 21 sind diese Werte für die verschiedenen Glykoside als Säulen dargestellt. Die Anzahl der Versuche für jedes Cardenolid betrug n = 4 - 6. Bei allen Glykosiden außer Digitoxin, AL 107, Dihydroouabain und Ouabain ist die Abklingzeit bis zum Ausgangswert länger als die Zeit bis zum maximalen Kraftanstieg. Die Wirkung von CAcBE klingt am langsamsten ab, denn die Kontraktionskraft erreicht erst nach 160 Minuten den Ausgangswert. Dagegen erreicht die Kontraktionskraft der mit AL 107 bzw. NSM behandelten Vorhöfe am schnellsten den Ausgangswert (5 bzw. 8 Minuten). Die höchsten Wirkungsgeschwindigkeiten haben NSM, Methylconvallatoxin und AL 107 (7, 8 und 9 Minuten). Digitoxin braucht 114 Minuten um seine maximale Wirkung zu erreichen und ist damit das Glykosid mit der langsamsten Wirkungsgeschwindigkeit. In Abbildung 22 ist die Zeit bis zum "steady state" nach der Einzelgabe des Glykosids auf die Ordinate und die Abklingzeit auf die Abszisse aufgetragen. Die Korrelation ist durch eine Gerade

mit folgender Gleichung repräsentiert:

$$y = 0,5\ x + 5,8.$$

Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,78. Auffallend ist, daß die Werte für Digitoxin und CAcBE relativ stark abweichen. Läßt man diese Werte außeracht, so zeigt sich eine bessere Korrelation mit einem Koeffizienten von 0,96. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse dieser Versuche zusammengefaßt und das Verhältnis zwischen der Zeit bis zur maximalen Kontraktionskraft-Zunahme (t_{max}) und der Abklingzeit (t_A) als Quotient berechnet. Der Quotient 11 der untersuchten Cardenolide ist unter 1 (0,32 - 0,88). Dies bedeutet, daß die Abklingzeit gewöhnlich länger ist als die Wirkungsgeschwindigkeit. Ausnahmen bilden AL 107, Ouabain und Dihydroouabain mit verhältnismäßig kurzen Abklingzeiten und Digitoxin mit einem sehr langsamen Wirkungseintritt.

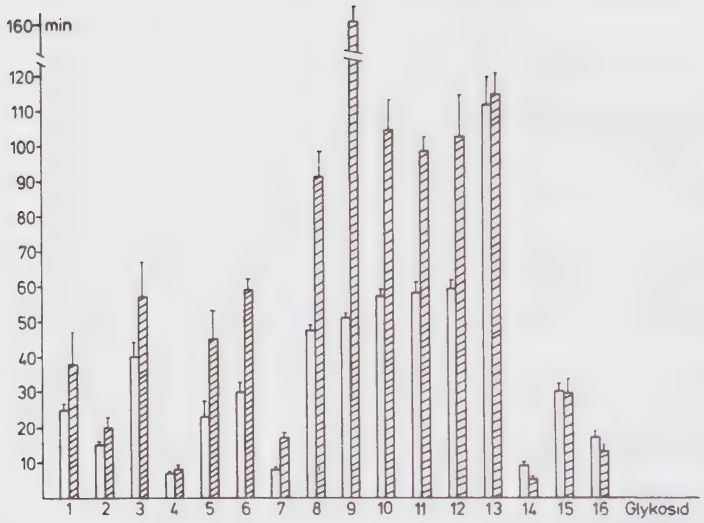


Abb. 21: Geschwindigkeit des Eintritts der maximal inotropen Wirkung ▭ und des Abklingens der Wirkung nach Badwechsel ▨

1 k-Strophanthosid	7 Methylconvallatoxin	12 Digoxin
2 Strophanthidol	8 CAc	13 Digitoxin
3 NS	9 CAcBE	14 AL 107
4 NSM	10 k-Strophanthosid	15 Ouabain
5 Cymarin	11 k-Strophanthosid/ Borsäure Gemisch	16 Dihydroouabain
6 Convallatoxin		

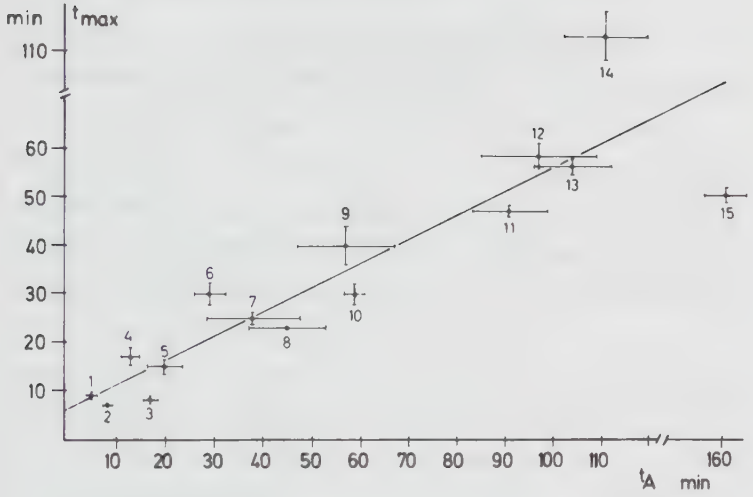


Abb. 22: Beziehung zwischen der Geschwindigkeit des Eintritts der maximalen positiv inotropen Wirkung (t_{max}) und des Abklingens der Wirkung nach 6-fachem Badwechsel bis zum Ausgangswert (t_A).

1 AL 107	6 Ouabain	11 CAc
2 NSM	7 k-Strophanthidin	12 Digoxin
3 Methylconvallatoxin	8 Cymarin	13 k-Strophanthosid
4 Dihydroouabain	9 NS	14 Digitoxin
5 Strophanthidol	10 Convallatoxin	15 CAcBE

Tabelle 6: Geschwindigkeit des Eintritts der maximalen positiv inotropen Wirkung (t_{max}) und des Abklingens der Wirkung nach Badwechsel bis zu dem Ausgangswert (t_A).
K = Cardenolidkonzentration, die als Einzelgabe zur Einwirkung kam

GLYKOSID	K µmol	t_{max} (Min.)	t_A (Min.)	Quotient t_{max}/t_A
k-Strophanthidin	68,1	25 ± 1,2	38 ± 9	0,66
NS	56,2	40 ± 4,4	57 ± 10	0,70
NSM	17,8	7 ± 0,25	8 ± 0,89	0,88
Strophanthidol	3,16	15 ± 1	20 ± 3	0,75
Cymarin	2,15	23 ± 0,14	45 ± 8,4	0,51
Convallatoxin	0,383	30 ± 2,2	59 ± 2,2	0,51
Methyl-convallatoxin	0,825	8 ± 0,5	17 ± 1,7	0,47
CAc	0,825	48 ± 0,95	91 ± 7,8	0,53
CAcBE	0,261	51 ± 1,4	161 ± 4	0,32
Digitoxin	0,261	141 ± 5	111 ± 9	1,27
AL 107	21,5	9 ± 0,74	5 ± 1	1,80
Digoxin	1,21	59 ± 2,6	97 ± 12	0,61
k-Strophanthosid	1,21	57 ± 2	104 ± 8	0,55
Ouabain	0,825	30 ± 2	30 ± 3	1
Dihydro-ouabain	26,1	17 ± 1,7	13 ± 1,7	1,31

6. Hemmung der kardialen Na^+,K^+-ATPase-Aktivität

Unsere Versuche wurden mit drei Enzympräparaten durchgeführt.

In Tabelle 7 a sind Werte der gesamten Aktivität in Anwesenheit von Mg^{2+}-, Na^+- und K^+-Ionen und der in Anwesenheit von den erwähnten Ionen und von 1 mmol/l g-Strophanthin angegeben. Die Differenz der Gesamtaktivität und der in Anwesenheit von g-Strophanthin betrachten wir als Na^+,K^+-ATPase. Sie beträgt in den 3 Enzympräparaten 20,8; 29,5 und 28,4 µmol P_i/mg Protein x Stunde. Die von uns gemessene Na^+,K^+-ATPase Aktivität ist höher als die in den Arbeiten von Peters et al. (1974), Fricke et al. (1981) und Hegyvary et al. (1981). Die Werte von Nakao (1965), Akera et al. (1969), Zavecz und Dutta (1977) und Fox (1979) korrelieren gut mit unseren Werten.

Von den an Vorhöfen untersuchten Cardenoliden wurden 8 Substanzen für Versuche an der Na^+,K^+-ATPase verwendet. Dabei handelt es sich um 4 semisynthetische Präparate und - zum Vergleich - vier bekannte Glykoside: AL 107 und Digitoxin; CAc, CAcBE und Convallatoxin; NSM und k-Strophanthosid sowie Ouabain. Alle Glykoside verursachen eine Hemmung der Na^+,K^+-ATPase Aktivität. Ihre Wirksamkeit ist aber unterschiedlich wie es an den Konzentrations-Wirkungskurven der Abbildung 23 zu erkennen ist.

In Tabelle 7 b sind diejenigen Cardenolidkonzentrationen gegenübergestellt, die eine 50%ige Hemmung der Na^+,K^+-Aktivität verursachen (I_{50}). Daraus läßt sich ihre Affinität zu diesem Enzym vergleichen: Digitoxin hat von allen getesteten Cardenoliden die höchste Affinität zu diesem Enzym mit einer I_{50} = 0,411 µmol/l. Convallatoxin, k-Strophanthosid, Ouabain und CAc bilden eine Gruppe mit einer Affinität zwischen 0,6 und 0,9 µmol/l. Eine auffallend niedrige Affinität besitzen NSM und AL 107 mit I_{50} = 7,90 bzw. 12,30 µmol/l.

Zur Bestimmung der Reversibilität der Hemmung der kardialen Na^+,K^+-ATPase wurde die Aktivität des Enzyms vor und nach einer 10-fachen Verdünnung des Enzymansatzes in Anwesenheit von der gleichen Konzentration des Glykosids gemessen (Peters et al., 1974). Für jedes Cardenolid wurden 3 - 5 Versuche durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt und zeigen, daß keine großen Unterschiede bezüglich der Reversibilität der Hemmung unter unseren Versuchsbedingungen bei den verschiedenen Cardenoliden bestehen. Es ist zu berücksichtigen, daß die Inkubationszeit 30 Minuten betrug, für weitere zeitabhängige Bestimmungen der Reversibilität standen keine ausreichenden Mengen der Cardenolide zur Verfügung.

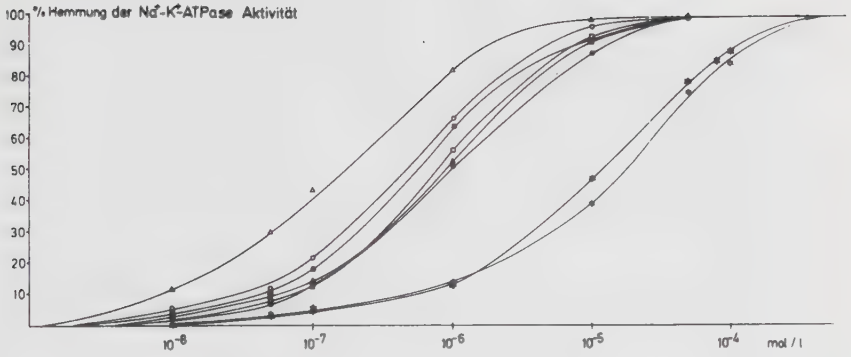


Abb. 23: Einfluß ansteigender Cardenolidkonzentration auf die Aktivität der Na^+,K^+-ATPase des Meerschweinchenherzens
Digitoxin Δ, CAcBE O, Convallatoxin ■, k-Strophanthosid [], Ouabain Δ, CAc ●, NSM ✱, AL 107 ✿,

Tabelle 7: a) Aktivität von drei Enzympräparationen aus je 12 - 15 Meerschweinchenventrikel in µmol P_i/mg Protein · Stunde

	1	2	3
Gesamtaktivität in Anwesenheit von Na^+, K^+ und Mg^{++}	22,1	31,5	30,2
+ g-Strophanthin 1 mmol/l	1,3	2,0	1,8
Differenz "Na^+,K^+-aktivierbare ATPase"	20,8	29,5	28,4

b) Cardenolidkonzentrationen, die eine 50 %ige Hemmung der Na^+,K^+-ATPase-Aktivität verursachen (I_{50})

GLYKOSID	I_{50} µmol/l
Digoxin	0,152 ± 0,011
CAcBE	0,411 ± 0,028
Convallatoxin	0,637 ± 0,047
k-Strophanthosid	0,676 ± 0,048
Ouabain	0,739 ± 0,053
CAc	0,895 ± 0,063
NSM	7,90 ± 0,56
AL 107	12,30 ± 0,93

Tabelle 8: Reversibilität der durch die Cardenolide verursachten Hemmung der Na^+,K^+-ATPase

Cardenolid	Reversibilität in %
NSM	91 ± 4
Ouabain	93 ± 4
CAc	97 ± 4
CAcBE	99 ± 2
Convallatoxin	100 ± -
k-Strophanthosid	100 ± -
AL 107	100 ± -
Digitoxin	93 ± 3

7. Bindungsstudien an Meerschweinchenherzhomogenat

In dieser Versuchsreihe wurden die gleichen 8 Cardenolide verwendet wie in den Versuchen zur Hemmung der Na^+,K^+-ATPase. Für die Bindungsstudien wurde radioaktivmarkiertes Glykosid (^{3}H-Ouabain) verwendet. Das markierte Glykosid wurde mit Herzgewebe 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Dabei erfolgte eine Bindung an die Rezeptoren, bis sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Glykosid einstellte. Dann wurde unmarkiertes Glykosid bzw. Cardenolid dem Reaktionsmedium zugegeben und bei 37°C inkubiert. Das freie unmarkierte verdrängt gebundenes markiertes Glykosid aus den Bindungsstellen bis ein Gleichgewicht entsteht. Die Verdrängungsversuche wurden mit verschiedenen Konzentrationen der unmarkierten Cardenolide durchgeführt.

a) Zeitabhängige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain

Die Inkubationszeiten, die nötig sind, um ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Cardenolid zu erreichen, wurden in zeitabhängigen Verdrängungsversuchen von ^{3}H-Ouabain bestimmt. Hierfür wurden Cardenolidkonzentrationen ausgesucht, die eine 25 bis 60%ige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain verursachten. Die Zeitpunkte, zu dem sich ein Gleichgewicht der Bindung von ^{3}H-Ouabain und der der unmarkierten Cardenolide einstellte, sind in Tabelle 9 aufgeführt. Daraus ist zu erkennen, daß mit Ouabain, NSM und AL 107 relativ schnell ein Gleichgewicht erreicht wird (20 bis 25 Minuten) und Digitoxin die längste Zeit benötigt.

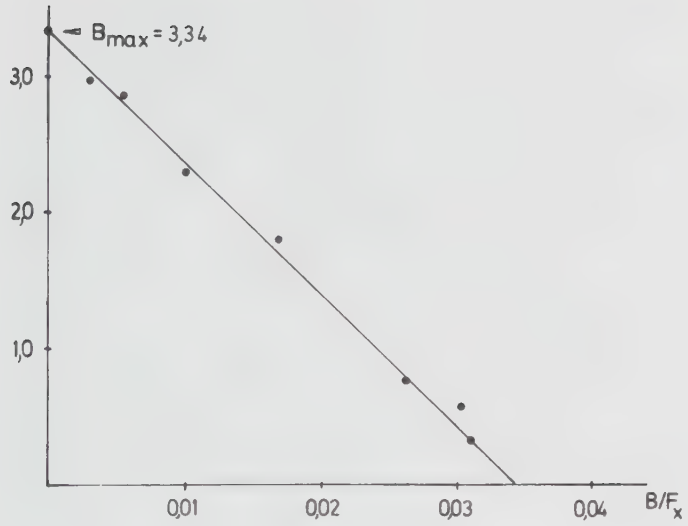


Abb. 24: Ein Scatchard Plot für Ouabain

B_{max} = maximal gebundenes ^{3}H-Ouabain = maximale Rezeptorkonzentration

B = gebundenes ^{3}H-Ouabain

F_x = freies ^{3}H-Ouabain

b) Konzentrationsabhängige Verdrängung

Zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Verdrängung des radioaktiven Ouabain durch unmarkiertes Ouabain wurden Bindungsversuche durchgeführt und mit Hilfe eines Scatchard Plot ausgewertet. Abbildung 24 stellt einen repräsentativen Scatchard Plot dar. Aus 7 Versuchen wurden die Mittelwerte für B_{max} und K_{Dx} ermittelt. B_{max} ist die maximale Rezeptorkonzentration und entspricht dem Schnittpunkt mit der Ordinate. K_{Dx} ist die Dissoziationskonstante und entspricht der Konzentration des unmarkierten Glykosids, die eine 50%ige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain verursacht. Numerisch entspricht K_{Dx} dem absoluten Wert der Steigung der Geraden in pmol/l ausgedrückt.

Entsprechende Bindungsstudien mit den anderen Cardenoliden waren nicht möglich, da keine analog markierten Cardenolide zur Verfügung standen. Die K_{Dx}-Werte wurden deshalb nach der Methode von Erdmann und Schoner (1974) ausgerechnet. Tabelle 9 faßt die K_{Dx}-Werte der getesteten Cardenolide zusammen.
Jedes Cardenolid wurde an 5 - 6 verschiedenen Herzhomogenatpräparationen getestet, wobei mit jeder Präparation eine 4-fache Bestimmung durchgeführt wurde (n = 20-24).

In Abbildung 25 ist die konzentrationsabhängige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain durch die getesteten Cardenolide dargestellt. Hier ist zu erkennen, daß die Cardenolide

Tabelle 9: Ergebnisse von Bindungsstudien mit Homogenat aus Meerschweinchenherzen

Cardenolid	t_G	K_{Dx} in µmol/l
CAcBE	40	0,023 ± 0,004
Digitoxin	70	0,024 ± 0,004
CAc	40	0,083 ± 0,003
Ouabain	20	0,088 ± 0,005
Convallatoxin	30	0,098 ± 0,001
k-Strophanthosid	50	0,122 ± 0,009
NSM	25	1,07 ± 0,08
AL 107	25	1,75 ± 0,10

t_G = Zeitpunkt zu dem sich ein Gleichgewicht zwischen den zugesetzten Cardenoliden und ^{3}H-Ouabain ergab in Min.

K_{Dx} = Cardenolidkonzentration, die eine 50%ige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain verursachte

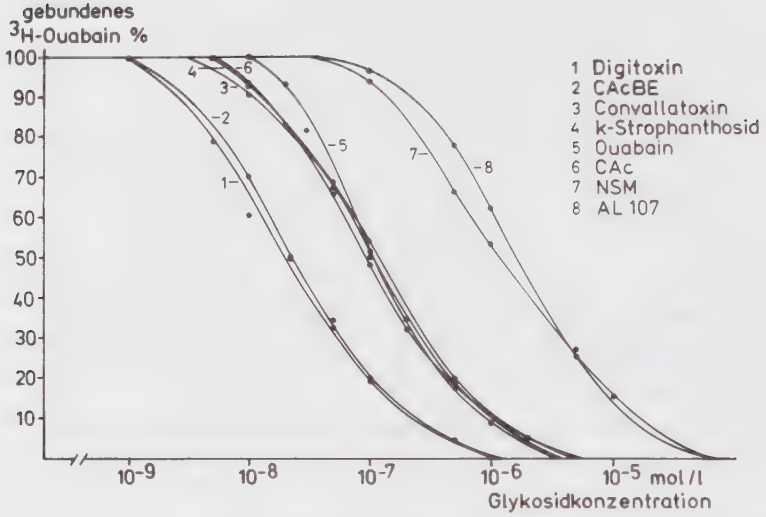


Abb. 25: Verdrängungsstudien am Homogenat des Meerschweinchenherzens

verschiedene Affinitäten zum Herzgewebe haben. Die stärksten Affinitäten haben CAcBE und Digitoxin, d.h., diese Substanzen verdrängen ^{3}H-Ouabain schon in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich.

Es folgen k-Strophanthosid, Convallatoxin, CAc und Ouabain, die eine mittlere Gruppe bilden, in der die Konzentrations-Wirkungskurven fast miteinander übereinstimmen. Erst in einem höheren Konzentrationsbereich verdrängen NSM und AL 107.

Um die an Meerschweinchenvorhöfen gemessenen pharmakodynamischen Wirkungen mit der hier gemessenen biochemischen Wirkung zu vergleichen, wurde eine Korrelation aufgestellt zwischen EC_{50} und I_{50} bzw. K_{Dx}. Abbildung 26 zeigt eine gute Korrelation zwischen EC_{50} und I_{50} bzw. K_{Dx} mit Korrelationskoeffizienten von 0,96 bzw. 0,98. Die Korrelationen sind mit zwei Geraden repräsentiert, die die folgenden Gleichungen haben:

$$\log I_{50} = 0{,}81 \log EC_{50} - 0{,}75$$

$$\log K_{Dx} = 0{,}93 \log EC_{50} - 1$$

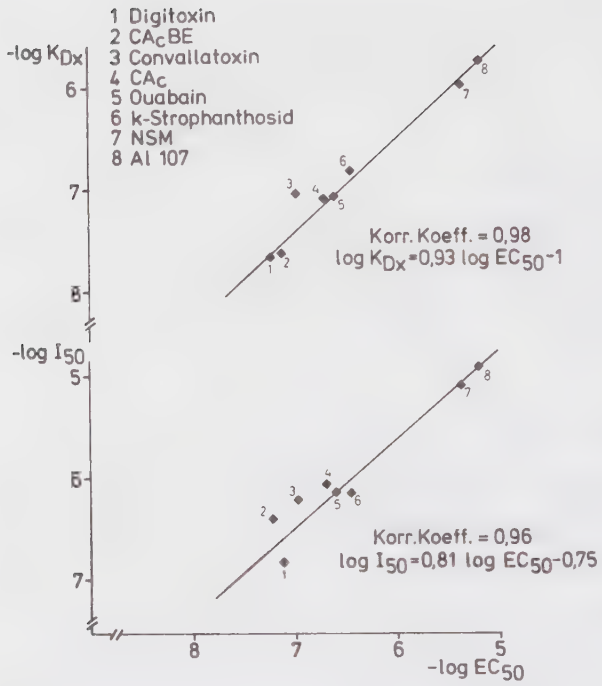


Abb. 26: Korrelation zwischen EC_{50} und K_{Dx} bzw. I_{50}

Tabelle 10: Zusammenfassung der EC_{50}-, I_{50}- und K_{Dx}-Werte der untersuchten Cardenolide und die Verhältnisse dieser Konzentrationen zueinander.

GLYKOSID	EC_{50} µmol/l	I_{50} µmol/l	K_{Dx} µmol/l	EC_{50}/I_{50}	EC_{50}/K_{Dx}
CAcBE	0,061	0,411	0,023	0,2	2,7
Digitoxin	0,076	0,152	0,023	0,5	3,2
Convallatoxin	0,106	0,637	0,098	0,2	1,1
CAc	0,202	0,895	0,083	0,2	2,4
Ouabain	0,250	0,739	0,088	0,3	2,8
k-Strophanthosid	0,352	0,676	0,122	0,5	2,9
NSM	4,370	7,90	1,07	0,5	4,1
AL 107	6,56	12,3	1,75	0,5	3,8
Mittelwerte				$0,4 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,3$

D. DISKUSSION

1. Versuche an isolierten elektrisch gereizten Herzpräparaten

Unsere Untersuchungen ergaben, daß sich die von uns verwendeten Cardenolide deutlich in ihrer Wirkungsstärke und in ihrer intrinsischen Aktivität unterscheiden. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Sie zeigt, daß CAcBE die höchste und k-Strophanthidin die niedrigste Affinität am isolierten Vorhofpräparat des Meerschweinchens besitzt. Andererseits besitzt Dihydroouabain und k-Strophanthidin die höchste und BCAc die niedrigste intrinsische Aktivität. Im folgenden wird versucht, mögliche Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und pharmakodynamischer Wirkung der Cardenolide zu diskutieren.

a) Cardenolide der Convallatoxingruppe

In der Convallatoxingruppe läßt sich mit Hilfe der Versuche an isolierten Vorhofpräparaten folgende Reihenfolge bezüglich der Affinität der einzelnen Cardenolide aufstellen: CAcBE > Convallatoxin > CAc > BCAc. Zorbach und Pietsch (1962) postulieren, daß die Wirkung eines Glykosids um so stärker ist, je mehr freie Hydroxylgruppen am Genin und am Zuckeranteil gebunden sind.
In anderen Arbeiten wurde nachgewiesen, daß Hydroxylsubstitutionen am Zuckerteil eine andere Wirkung haben, als wenn die Substitution am Genin erfolgt. Schlegel et al. (1955), Juhasz und Tamm (1961), Henderson und Chen (1962),

Kovarikova et al. (1964) und Brandt et al. (1966), z.B. weisen eine Abschwächung der Digitoxigeninwirkung an Herzgeweben durch Hydroxylsubstitution nach. Unter den von uns getesteten Substanzen hat Convallatoxin die meisten freien Hydroxylgruppen, dann folgt Methylconvallatoxin mit einer C3'-Methoxygruppe, CAc mit einer Acetonidgruppe, die die beiden C2' und C3'-Hydroxylgruppen blockieren, und schließlich kommt BCAc, welches zusätzlich zur entsprechenden Acetonidgruppe eine durch Buttersäure veresterte C 4'-Hydroxylfunktion aufweist. In dieser Reihenfolge lassen sich auch die Substanzen bezüglich ihrer Affinität einordnen, und so stimmen unsere Ergebnisse mit der Aussage von Zorbach und Pietsch (1962) bezüglich der freien Hydroxylgruppen im Zuckerteil überein. CAcBE zeigt aber ein anderes Verhalten. Wie in CAc und BCAc sind die Hydroxylgruppen an C2' und C3' im Zuckerteil durch eine Acetonidgruppe besetzt, dazu sind die beiden C5 und C19 Hydroxylgruppen im Aglykon durch Veresterung mit Borsäure blockiert. Trotzdem zeigt CAcBE eine sehr hohe Affinität zum Herzgewebe. Das läßt sich dadurch erklären, daß die freien Hydroxylgruppen im Zuckerteil nicht die gleiche Rolle spielen, wie diese am Aglykon.

Als mögliche Ursache der hohen Affinität von CAcBE sei folgendes bemerkt:

Chemisch ist CAcBE ein Ester von Borsäure und CAc nach Reduktion der Aldehydgruppe an C10.Henderson und Chen (1962) zeigten, daß die Veresterung der Hydroxylgruppen im Gitoxigenin mit Essigsäure die Wirksamkeit verstärkt.

Bei Digitoxigenin aber wird die Wirksamkeit durch Veresterung dieser Gruppe abgeschwächt (Henderson und Chen, 1965). Andere Autoren haben ebenfalls den Einfluß der Veresterung von Hydroxylgruppen an Herzglykosiden geprüft. Haustein et al. (1966), Haustein (1973, 1974), Haustein et al. (1980) und Scheller et al. (1975) untersuchten die Salpetersäure- und Essigsäureester einiger Herzglykoside und haben festgestellt, daß sich die Wirkung der verschiedenen Glykoside und deren Ester voneinander unterscheiden. Bei CAcBE handelt es sich um die Veresterung von einem Convallatoxolderivat, d.h. k-Strophanthidol als Aglykon. Hier hat die Veresterung der Hydroxylgruppen an C5 und C19 zu einer erhöhten Wirksamkeit geführt. Die unterschiedlichen Affinitäten zwischen der veresterten und unveresterten Form des Glykosids haben sich auch bei der Hemmung der Herz-Na^+,K^+-ATPase und bei den Bindungsstudien am Herzhomogenat bestätigt. Die Konzentrationen, die eine 50%ige Hemmung der Na^+,K^+-ATPase (I_{50}) verursacht, ist bei CAc viel höher als bei CAcBE. Das gleiche gilt auch für die Konzentration, die eine 50%ige Verdrängung des ^{3}H-Ouabain (K_{Dx}) verursacht. Wenn man die Strukturformel von CAcBE betrachtet, könnte man vermuten, daß der Borsäureester in der Lösung gespalten wird und das veresterte Glykosid und Borsäure entsteht. So könnte die stärkere Wirkung von CAcBE verglichen mit CAc nur aufgrund einer katalytischen Wirkung der freigesetzten Borsäure zustande kommen. Um dies zu klären, haben wir Versuche mit einem äquimolaren Gemisch von Borsäure und k-Strophanthosid bzw. CAc bzw. Convallatoxol durchgeführt.

Die Versuchsergebnisse schließen eine katalytische Wirkung der Borsäure aus, da die Konzentrations-Wirkungskurven des CAc bzw. k-Strophanthosids und ihres äquimolaren Gemisches mit Borsäure übereinstimmen (Abb. 19) und erhärtet den Befund, daß die Veresterung von den C5 und C19 Hydroxylgruppen mit Borsäure eine Verbindung ergibt, die eine höhere Affinität zum Herzgewebe hat, wofür möglicherweise der Lewis-Säure-Charakter des Boresters, der eine Elektronenpaarlücke aufweist, verantwortlich ist.
Als mögliche Ursache der niedrigen Wirkungsstärke von BCAc sei folgendes bemerkt:
BCAc hat im Zuckerteil nur eine freie Hydroxylgruppe weniger als CAc, trotzdem hat es eine viel niedrigere Affinität und geringere intrinsische Aktivität als CAc.

Für die hohe Affinität zum Herzgewebe und eine maximale Hemmung der Na^+,K^+-ATPase benötigt das Herzglykosid nach Erdmann und Schoner (1974) einen ungesättigten Laktonring, ein Steroidgerüst und eine Zuckerkomponente. Das alles hat auch BCAc. Nach Yoda und Hokin (1970) und Yoda (1973) hat der Zuckerteil eine spezielle Bindungsstelle am Rezeptor, d.h. also, um eine hohe Wirkung zu erreichen, muß der Zuckerteil sich an dieser Bindungsstelle gut binden können. So kann man die schwache intrinsische Aktivität von BCAc dadurch erklären, daß durch die Butyrylgruppe die Struktur des Moleküls so verändert ist, daß durch eine sterische Hinderung die Bindung des Zuckerteils an seine spezifische Bindungsstelle gehemmt ist und somit die Wirkung des Glykosids

abgeschwächt wird.

Den Unterschied in den Affinitäten und Wirkungsstärken der Glykoside der Convallatoxingruppe kann man also auf die Änderung einzelner Gruppen in der Struktur von Convallatoxin zurückführen; auch Änderungen im Zuckerteil verursachen wesentliche Unterschiede in der Wirkung der verschiedenen Derivate. Diese Befunde widersprechen der Aussage von Luchi und Conn (1965), daß die Wirkung des Glykosids vom Aglykon stammt, während der Zuckerteil eine große Rolle nur in der Pharmakokinetik dieser Substanzen spielen soll. Auch Haustein behauptet in seiner Arbeit (1974), daß die Konstitution des Zuckerteils keine große Bedeutung hat. Neben unseren Befunden findet man weitere Bestätigungen für die Bedeutung des Zuckerteils bezüglich der Wirkungsstärke und therapeutischen Breite der Cardenolide in Arbeiten von Cardwell und Nash (1976, 1978), Cook et al. (1977), Mendez et al. (1974), Thomas et al. (1979) und Brown et al. (1981). Cardwell und Nash (1974) und Cook et al. (1977) untersuchten Aminozuckerglykoside und stellten fest, daß nicht nur die Wirkungsstärke sondern auch die therapeutische Breite durch die Aminogruppe im Zuckerteil erhöht wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis EC_{50}/EC_{max} und die Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve als Hinweis auf die therapeutische Breite genommen. In der Convallatoxingruppe nimmt die therapeutische Breite mit der Zunahme freier Hydroxylgruppen am Molekül ab. CAcBE und BCAc, die Convallatoxinderivate mit der

niedrigsten Anzahl freier Hydroxylgruppen, haben eine sehr flache Konzentrations-Wirkungskurve verglichen mit den anderen geprüften Glykosiden; auch das prozentuale Verhältnis EC_{50}/EC_{max} ist niedrig (23 % bzw. 20 %). so gehört CAcBE und BCAc unter den getesteten Glykosiden zu denen, die eine größere therapeutische Breite besitzen. CAc und Methylconvallatoxin haben in dieser Gruppe eine mittlere Position, d.h., sie haben eine therapeutische Breite,die geringer ist als die von CAcBE und größer als die von Convallatoxin.

Die untersuchten Cardenolide unterscheiden sich nicht nur in ihrer inotropen Wirkungsstärke sondern auch in ihrer Wirkungsgeschwindigkeit und Haftbarkeit am Herzgewebe.
Nach einer Einzelgabe des Glykosids zu den linken Meerschweinchenvorhöfen wurde die Zeit bis zum Erreichen einer gleichmäßigen Kontraktionsamplitude (steady state) als Maßstab für die Wirkungsgeschwindigkeit und die Zeit nach dem Auswaschen bis zum Erreichen des Ausgangswertes als Maßstab für die Haftbarkeit angesehen. Wie schon vorher erwähnt wurde, unterscheidet sich CAcBE von CAc durch den Borsäureester an der C5 Hydroxylgruppe und an der reduzierten Carboxylgruppe an C10. Die Wirkungsgeschwindigkeit beider Substanzen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, sie sind etwas höher als die von Convallatoxin. Die Haftbarkeit der drei Substanzen zeigt aber signifikante Unterschiede.

Convallatoxin braucht 59 Minuten, CAc 91 und CAcBE 161 Minuten bis die positiv inotrope Wirkung abgeklungen ist. CAcBE ist also das Glykosid, das am stärksten am Gewebe haftet, nicht nur unter den Convallatoxinen sondern auch, wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, unter allen 18 getesteten Glykosiden. Diese unterschiedliche Haftbarkeit könnte man durch die verschiedenen substituierten Gruppen erklären. Die Acetonidgruppe an C2' und C3' am Zuckerteil des Convallatoxins könnte dafür verantwortlich sein, daß CAc stärker am Herzgewebe haftet. Die Veresterung von CAc zu CAcBE könnte die Haftbarkeit weiter erhöht haben. Daß die Borsäureesterbindung bei CAcBE und nicht die katalytische Wirkung der Borsäure für diese erhöhte Haftbarkeit verantwortlich ist, wurde durch den Auswaschversuch von dem äquimolaren k-Strophanthosid/Borsäure Gemisch bewiesen. Dieses Gemisch hat die gleiche Wirkungsgeschwindigkeit und Haftbarkeit wie k-Strophanthosid allein.

Bei Methylconvallatoxin wurde die C3'-Hydroxylgruppe veräthert. Diese Substitution verursachte, wie vorher erwähnt wurde, keine große Änderung der Wirkungsstärke des Convallatoxin, die Konzentrations-Wirkungskurve wurde aber flacher. Auch bei der Wirkungsgeschwindigkeit zeigt die Methylgruppe einen deutlichen Einfluß. Methylconvallatoxin hat eine schnellere Wirkungsgeschwindigkeit und eine schwächere Haftbarkeit als Convallatoxin, CAc und CAcBE.

Dieses Verhalten kann nur durch die Methylierung zustande gekommen sein. Durch diese Substitution könnte die Diffusion dieses Derivates erhöht sein und somit die Wirkungsgeschwindigkeit von Methylconvallatoxin.

b) Weitere Cardenolide die k-Strophanthidin als Aglykon haben

Von den k-Strophanthidin als Aglykon enthaltenden Cardenoliden wurden in dieser Arbeit noch weitere Substanzen untersucht. NS enthält k-Strophanthidin, das anstatt mit einem Zuckeranteil an der C3 Hydroxylgruppe mit einem Nikotinylrest verbunden ist. Seine N-quaternisierte Form ist das NSM. Hier lassen sich ebenfalls Unterschiede in der Wirkung durch die Änderung einiger funktioneller Gruppen beobachten. Die drei Substanzen k-Strophanthidin, NS und NSM wirken in einem höheren Konzentrationsbereich als die anderen Glykoside. k-Strophanthidin hat die niedrigste Affinität (EC_{50} = 18,6 µmol/l), es folgen NS (EC_{50} = 10,2 µmol/l) und NSM mit EC_{50} = 4,37 µmol/l. An dieser Reihenfolge erkennt man, daß eine zusätzliche Nikotinylgruppe die Affinität der Ausgangssubstanz (k-Strophanthidin) erhöht. Das quaternäre Derivat NSM hat eine noch stärkere Affinität als NS und k-Strophanthidin. Diese erhöhte Affinität könnte durch die Quaternisierung verursacht worden sein. Die quaternisierte Form NSM ist durch die positive Ladung polarer als NS und k-Strophanthidin. Das erklärt seine hohe Wirkungsgeschwindigkeit und geringe Haftbarkeit am Herzgewebe.

Die Bedeutung der Polarität wird durch den Vergleich zwischen k-Strophanthidin und Strophanthidol bestätigt. k-Strophanthidin ist weniger polar als Strophanthidol und hat somit eine geringere Affinität.
Wenn man die therapeutische Breite betrachtet (Tabelle 2), erkennt man, daß NSM die größte therapeutische Breite hat, nicht nur unter den Glykosiden, die k-Strophanthidin als Aglykon besitzen, sondern allgemein unter allen geprüften Glykosiden. Es hat die flachste Konzentrations-Wirkungskurve und die EC_{50} ist 20 % seiner EC_{max}.
Das andere Extrem ist Dihydroouabain mit einer ebenso hohen intrinsischen Aktivität aber einer sehr geringen therapeutischen Breite. Seine Konzentrations-Wirkungskurve ist extrem steil und seine EC_{50} beträgt 36 % seiner EC_{max}.
Die Quaternisierung eines Glykosids (NSM), die eine neue Art der chemischen Veränderung von Herzglykosiden darstellt, hat also einen großen Einfluß auf die Glykosidwirkung.

c) Allgemeiner Vergleich aller untersuchten Cardenolide mit k-Strophanthidin als Aglykon

Ein allgemeiner Vergleich aller untersuchten Cardenolide, die k-Strophanthidin als Aglykon haben (Strophanthidol, k-Strophanthidin, NS, NSM, Cymarin, Convallatoxin, Methylconvallatoxin, CAc, BCAc, CAcBE, k-Strophanthosid) bestätigt die Ergebnisse von Förster und Pâvek (1964). Diese Autoren zeigten aufgrund von Versuchen an gesunden und insuffizienten

Herzpräparaten, daß Unterschiede in der Konstitution des Zuckers bei identischem Genin einen deutlichen Einfluß auf die Wirkungsstärke des Glykosids haben können.

d) Cardenolide der Digitalisgruppe

Betrachtung der Wirkung von AL 107 im Vergleich zu den anderen Digitalisglykosiden und im Vergleich zu den Angaben der Literatur

Die Digitalisglykoside lassen sich bezüglich ihrer Affinität in folgende Reihenfolge ordnen: Digitoxin > Digitoxigeninmonodigitoxosid > Digoxin > Digoxigeninmonodigitoxosid > 3-α-Methyldigitoxigeninmonoglucosid (AL 107).

AL 107 ist ein Digitoxinderivat, bei dem der Zuckerteil Glucose ist und das an C3 methyliert ist. Viele Arbeiten sind in den letzten Jahren erschienen, in denen verschiedene an C3 substituierte Glykoside untersucht wurden (Albrecht und Kunz, 1975; Albrecht und Neugebauer, 1975, 1976, 1977; Siebeneick und Hoffmann, 1978). Es wurden Wirkungsunterschiede bei den verschiedenen Derivaten festgestellt. In den letzten Jahren wurde AL 107 von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht (Lüllmann et al., 1979; Fath et al., 1979; Herbst, 1980; Chen und Fricke, 1981; Philipsborn, 1981; Fricke und Chen, 1982).

Unsere Befunde haben die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse teilweise bestätigt:

1) Die Affinität von Digitoxin und Digitoxigeninmonodigitoxosid ist mindestens 100-mal höher als die von AL 107.

2) AL 107 hat eine höhere Dissoziationskonstante an isolierten linken Vorhöfen und bei den Bindungsstudien, was Fox und Höltershinken (1982) auch an Koronararterien des Schweins bestätigten.

3) AL 107 hat eine kurze Halbwertszeit des ATPase-Glykosid-Komplex und

4) die Konzentrations-Wirkungskurve von AL 107 ist flacher als die von Digitoxin und Digitoxigeninmonodigitoxosid.

Lüllmann et al. (1979) haben aber einen großen Unterschied in der intrinsischen Aktivität zwischen AL 107 und Digitoxin gefunden, und sie nahmen die viel flachere Konzentrations-Wirkungskurve und die schnelle Auswaschbarkeit der Wirkung von AL 107 als Hinweis auf eine große therapeutische Breite. Das konnte in der vorliegenden Arbeit nicht voll bestätigt werden. Als erstes könnte man die Erklärung in den Dosierungsschemata der beiden Arbeiten finden. Bei Lüllmann et al. wurden die Konzentrationen der beiden Glykoside (Digitoxin und AL 107) kumulativ über konstante, gleichlange Intervalle gegeben (Peters,1982). In den Versuchen der vorliegenden

Arbeit wurden die Konzentrationen der Glykoside auch kumulativ gegeben, aber die Intervalle der Dosierungen richteten sich danach, ob eine gleichmäßige Kontraktionskraftamplitude (steady state) erreicht war. Digitoxin ist ein langsam wirkendes Glykosid, und daher braucht es, im Gegensatz zu AL 107, viel längere Zeit bis ein "steady state" erreicht wird.
Der Unterschied in den beiden Versuchsanordnungen könnte der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Digitoxin konnte wahrscheinlich durch die schnellere Dosierung im Fall der Experimente von Lüllmann et al. seine Wirkung nicht voll entfalten. Außerdem könnte die schnellere Akkumulation der Glykosidkonzentration zu einer früheren Toxizität führen. Diese Behauptung stimmt mit der Vorstellung von Dudek und Mantel (1979) überein, daß eine schnellere Steigerung der Glykosidkonzentration frühzeitig eine negativ inotrope Wirkung einleitet, so daß eine maximale Kraftentwicklung verhindert wird.
Als zweites ist die Kombination der schnellen Reversibilität der positiv inotropen Wirkung, d.h. die schnelle Auswaschbarkeit, mit der Steilheit der Kurve als ein Hinweis auf eine größere therapeutische Breite mit unseren Ergebnissen nicht zu vereinbaren; denn Dihydroouabain, ein Glykosid, das relativ gut auswaschbar ist, hat die steilste Konzentrations-Wirkungskurve und das höchste EC_{50}/EC_{max}-Verhältnis unter den 18 untersuchten Glykosiden, was auf eine niedrige therapeutische Breite hindeutet.

2. Bindungsstudien und Versuche an Na^+,K^+-ATPase

Die Ergebnisse aus den Bindungsstudien zeigen eine gute Korrelation zwischen der Bindung der Glykoside am Herzhomogenat und der Wirkung an linken Meerschweinchenvorhöfen (Abb. 27). In beiden Versuchsreihen haben Digitoxin und CAcBE die höchste und AL 107 und NSM eine sehr viel niedrigere Affinität. Auch die Zeiten bis zu einem Gleichgewicht der Verdrängung von ^{3}H-Ouabain durch die verschiedenen Glykoside korrelieren mit der Wirkungsgeschwindigkeit an linken Vorhöfen. Es ist aber zu beachten, daß die Zeit bis zum Gleichgewicht nicht die Assoziationskonstante reflektiert, da die untersuchten Glykoside ^{3}H-Ouabain verdrängt haben und nicht die entsprechenden radioaktiv markierten Analoge. Daß die K_{Dx}-Werte der Glykoside kleiner als die EC_{50}-Werte sind (EC_{50} = 2,9 x K_{Dx}, Tab. 10), ist dadurch zu erklären, daß bei den Bindungsstudien das Herzhomogenat benutzt wurde, das im Gegensatz zu den Vorhöfen ein nicht kompartimentierbares Präparat ist. Deswegen sind vermutlich die Rezeptoren beim Herzhomogenat viel leichter zu erreichen als bei den Vorhöfen. Zu ähnlichen Ergebnissen und Schlußfolgerungen sind Erdmann und Schoner (1974) gekommen, die auch eine Korrelation zwischen Hemmung der Herz-Na^+,K^+-ATPase und der positiv inotropen Wirkung an den Meerschweinchenvorhöfen (Abb. 27) finden, was mit früheren Arbeiten übereinstimmt (Erdmann et al., 1971; Gelbert und Goldmann, 1977). Die Korrelation zwischen der positiv inotropen Wirkung und der Hemmung der ATPase-Aktivität führt zu der Vorstellung, daß die Na^+,K^+-ATPase spezifische Rezeptoren für die Herzglykoside besitzt (Greeff, 1963; Akera et al., 1970; Akera, 1971;

Besch et al., 1970). Ob die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase für die positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside verantwortlicht ist, ist umstritten (Greeff et al., 1974; Langer, 1977; Okita et al., 1973; Okita, 1977; Roth-Schechter et al., 1970; Peters et al., 1974; Dal Pra et al., 1970; Bentfeld et al., 1977, Rhee et al., 1976; Murthy et al., 1974; Thomas et al., 1974; Zavecz und Dutta, 1977). In unseren Versuchen zeigten die Glykoside eine höhere Affinität zum Vorhofgewebe als zu der Na^+,K^+-ATPase-Präparation. Die EC_{50} bei allen untersuchten Glykosiden ist viel niedriger als die I_{50}, was man aus Tabelle 10 erkennen kann (EC_{50} = 0,4 I_{50}), obwohl die Vorhöfe kompartimentierbare Präparate sind und bei der Enzym-Präparation die Kompartimente nicht vorhanden sind. Die Bindung der Glykoside erfolgt also in niedrigeren Konzentrationen als für den positiv inotropen Effekt notwendig sind. Eine Hemmung der Na^+,K^+-ATPase zeigt sich erst bei höheren Konzentrationen. Diese Tatsache spricht dafür, daß die positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside und die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase-Aktivität nicht direkt miteinander gekoppelt sind. Die gute Korrelation beider Wirkungen könnte zu der Vermutung führen, daß die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase bei der kardialen Wirkung der Herzglykoside eine wichtige Rolle spielt. Sie ist jedoch vermutlich nicht die primäre Ursache dafür, daß die Glykoside unterschiedliche Affinitäten zu den zwei Präparaten haben. Zavecz und Dutta (1977) vermuten, daß die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase für die toxischen Wirkungen der Herzglykoside verantwortlich ist.

Zur Reversiblität der Hemmung der Na^+,K^+-ATPase durch Herzglykoside postulierten Yoda und Hokin (1970), daß die Bindung von Cardenolid-Aglykonen zu der Na^+,K^+-ATPase reversibel und von den Bufadienolid-Aglykonen jedoch nur teilweise reversibel ist. Die Bindung von den Glykosiden dagegen an die Na^+,K^+-ATPase ist irreversibel. Die Substitution an C3 des Aglykons mit dem Zuckerrest soll für diese Irreversibilität der Hemmung verantwortlich sein. Die Ergebnisse von Yoda und Hokin (1970) und Peters et al. (1974) können mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht verglichen werden, da die erwähnten Autoren Kalbsherz- und Kalbshirn-ATPase benutzten, während wir Meerschweinchen-ATPase verwendet haben. In unseren Reversibilitätsuntersuchungen sind keine großen Unterschiede zwischen den getesteten Glykosiden festgestellt worden. Für eine genauere Differenzierung zwischen den einzelnen Substanzen sollte man jedoch eine empfindlichere Methode benutzen.

3. Die Bedeutung der extrazellulären Calciumkonzentration

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Konzentrations-Wirkungskurven einiger Glykoside untersucht. Da nach Untersuchungen von Hasselbach (1964) und Schädler (1967) während der Kontraktion der Muskelzelle der intrazelluläre Gehalt an freien Calciumionen von etwa 5×10^{-8} auf 5×10^{-6} mol/l ansteigt, könnte man erwarten, daß geringere Änderungen der äußeren Calciumkonzentration die Kontraktionskraft beeinflussen.

Greeff et al. (1971) zeigten, daß eine Verdopplung der äußeren Calciumkonzentration die Wirkung von k-Strophanthin bei niedrigen Reizfrequenzen potenziert. Langer (1971 und 1977) behauptet, daß die Hemmung der Na^+-Pumpe des Sarkolemms durch Herzglykoside zu einer erhöhten intrazellulären Na^+-Konzentration führt, was einen erhöhten Calciuminflux über einen Na^+-Ca^{2+}-Austauschmechanismus verursacht. Für diesen Austauschmechanismus muß das extrazellulär befindliche Calcium an die äußere Membranoberfläche gebunden werden (Langer, 1978, 1980, 1981). An dieser Oberfläche befindet sich eine dünne Schicht, die sogenannte Glykocalyx die sich dadurch auszeichnet, daß sie besonders reich an Gangliosiden ist, die mit vielen Sialinsäureresten als mögliche Bindungsstellen der Calciumionen dienen. Die von uns untersuchten Glykoside zeigen alle eine deutliche Calciumabhängigkeit. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Reiter (1963), Alken et al., (1974) bei Versuchen mit Digitoxin und Digoxin am Meerschweinchenpapillarmuskel und Dudek und Mantel (1979) an isolierten Meerschweinchenvorhöfen und bei in-situ Meerschweinchen-Titrationsversuchen. Temma et al. (1982) stellten fest, daß der Digitoxin-Effekt im wesentlichen von der äußeren Calciumkonzentration unabhängig ist, d.h. die positiv inotrope Wirkung wird sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Calciumkonzentrationen beobachtet, jedoch nimmt die Wirkungsstärke mit steigender Calciumkonzentration zu. Bei allen von uns untersuchten Cardenoliden außer AL 107 ist die maximal erreichbare positiv inotrope Wirkung bei 0,6 mmol/l Calcium sehr viel schwächer als bei

1,2 mmol/l und 2,4 mmol/l Calcium in der Badflüssigkeit. Dieses Phänomen könnte zu der Schlußfolgerung führen, daß die herzwirksamen Cardenolide eine ausreichende extrazelluläre Calciumkonzentration benötigen,um die maximale Wirkung zu entfalten. Reiter (1963) bezeichnet die Glykosidwirkung als eine Sensibilisierung der Herzmuskelzelle gegen Calciumionen. Wenn man die Konzentrationswirkungskurven der untersuchten Glykoside bei verschiedenen Calciumkonzentrationen vergleicht, wird deutlich, daß Dihydroouabain und AL 107 weniger von der äußeren Calciumkonzentration abhängig sind als die übrigen Glykoside. Bei 1,2 mmol/l und 2,4 mmol/l äußerer Calciumkonzentration erreicht Dihydroouabain die gleichen Maxima der Kontraktionskraft. AL 107 zeigt das gleiche Verhalten, nur bei 0,6 mmol/l und 1,2 mmol/l äußerer Calciumkonzentration. Daß die Polarität des Glykosids der Grund für die geringere Calciumabhängigkeit der positiv inotropen Wirkung sein kann (Dudek und Mantel, 1979), läßt sich nicht aus unseren Ergebnissen ableiten. NSM als quaternisiertes und stark polares Glykosid, zeigt eine deutliche Calciumabhängigkeit bezüglich seiner positiv inotropen Wirkung. Die Kontraktionskraftmaxima, die von NSM bei verschiedenen Calciumkonzentrationen verursacht wurden, unterscheiden sich signifikant voneinander (Abb. 15).
Dudek und Mantel (1979) beobachteten, daß sich die maximalen positiv inotropen Wirkungen der verschiedenen von ihnen untersuchten Herzglykoside bei 2,4 mmol/l äußerer Calciumkonzentration nicht voneinander unterscheiden. Die von uns durchgeführten Versuche mit den verschiedenen Cardenoliden bei

den drei verschiedenen Calciumkonzentrationen (Abb. 9 bis 16) bestätigen diese Feststellung.

4) Schlußbemerkungen:

Aus den vorliegenden Ergebnissen können weitere Schlußfolgerungen abgeleitet werden:

a) In den Untersuchungen über Wirkungsgeschwindigkeit und Haftbarkeit haben einige Glykoside eine schnelle Wirkungs- und Abklinggeschwindigkeit, wie z.B. NSM, AL 107 und Dihydroouabain. Andere wie z.B. Digitoxin, Digoxin und CAcBE brauchen längere Zeit, um die maximale Wirkung zu erreichen und haften stark am Gewebe. Falls die Rezeptoren intrazellulär liegen sollten (Dutta et al., 1968; Park und Vincenzi, 1975; Fricke und Klaus, 1977 und 1978) so wäre ein Transportmechanismus der Herzglykoside durch die Zellmembran notwendig. Greenberger et al. (1969) und Dutta und Marks (1969) postulieren einen aktiven Transport, der die polaren Glykoside bevorzugt, während weniger polare mehr passiv diffundieren. Diese Vorstellung könnte die von uns beobachteten Ergebnisse erklären.Die polaren Glykoside wie z.B. NSM und Dihydroouabain werden durch aktiven Transport schneller die Rezeptoren erreichen, als die weniger polaren, die durch eine langsame passive Diffusion in die Zelle gelangen. Sollten die Glykosidrezeptoren an der Außenseite der Zellmembran liegen (Hoffmann, 1966; Perrone und Bolstein, 1973; Hilden et al.,1974; Schwartz et al., 1975; Temma et al., 1982), so könnte man postulieren, daß die mehr polaren, und damit auch in der Lösung

beweglicheren Glykoside schneller als die langsameren, weniger polaren Glykoside die Rezeptoren erreichen.

b) NSM, das neue semisynthetische Herzglykosid, zeigt eine neue Veränderung in der chemischen Strukturformel, verglichen mit den herkömmlichen Glykosiden. Der Zuckerteil ist durch eine Nikotinylgruppe ersetzt, und das Stickstoffatom ist quaternisiert. NSM hat eine hohe intrinsische Aktivität, wirkt aber in einem höheren Konzentrationsbereich.
Die flache Konzentrations-Wirkungskurve und das kleine EC_{50}/EC_{max}-Verhältnis deuten auf eine große therapeutische Breite hin. Cardwell und Nash (1976) postulieren, daß durch den stickstoffhaltigen Zuckerteil in dem neuen semisynthetischen Glykosid ASI-222 die therapeutische Breite größer geworden ist. Bei NSM gibt es keinen Zuckerteil aber einen Nikotinylrest, der auch stickstoffhaltig ist. So könnten die Ergebnisse, die mit NSM erhalten wurden, eine Bestätigung für die Aussage geben, daß ein Stickstoffatom am Zuckerteil oder an dem entsprechenden Teil eine große Rolle in der Wirkungsstärke und in der therapeutischen Breite spielt. Die erwähnten Autoren behaupten, daß ein stickstoffhaltiger Zucker am Genin gebunden die Paßform des Glykosids für den Rezeptor erhöht, was für die therapeutische Aktivität nötig ist.

c) Es gibt bestimmte Eigenschaften, die ein Glykosid haben soll, um in der praktischen Therapie verwendbar sein zu können. Eine größere therapeutische Breite und eine hohe Wirkungsstärke ist immer erwünscht. Um eine zu häufige Dosierung zu vermeiden, sollte die Glykosidwirkung keine schnelle Abklingquote haben, d.h. eine gewisse Haftbarkeit am Gewebe soll vorhanden sein. Von den hier untersuchten Glykosiden zeigt NSM eine hohe Wirkungsstärke und eine große therapeutische Breite. Die Wirkung dieses Glykosids klingt aber sehr schnell ab, d.h. NSM hat eine schwache Haftbarkeit am Gewebe. So müßte man sehr häufig dosieren, falls es in der Praxis verwendet werden soll. BCAc ist auch ein Glykosid, das eine flache Konzentrations-Wirkungskurve jedoch eine geringe intrinsische Aktivität hat.
CAcBE zeigt nach unseren Versuchen sehr günstige Eigenschaften. Da es eine relativ flache Konzentrations-Wirkungskurve und ein kleines EC_{50}/EC_{max}-Verhältnis im Vergleich zu den anderen untersuchten Glykosiden hat, kann man annehmen, daß es möglicherweise eine größere therapeutische Breite hat. Die intrinsische Aktivität ist geringer als die von NSM, aber sie ist doch relativ hoch. Außerdem hat dieses semisynthetische Glykosid eine sehr hohe Affinität zum Herzgewebe, es wirkt in einem sehr niedrige Konzentrationsbereich. Dazu kommt auch die starke Haftbarkeit von CAcBE am Gewebe, seine Wirkung klingt langsam ab, und so würde man dieses Glykosid nicht

so häufig dosieren müssen. Nach diesen Eigenschaften ist CAcBE eine vielversprechende Substanz, und durch weitere Versuche könnte sich CAcBE als ein ideales Glykosid für die Therapie der Herzinsuffizienz herausstellen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von 7 semisynthetischen Cardenoliden untersucht (Methylconvallatoxin, Convallatoxinacetonid "CAc", Butyryl-Convallatoxinacetonid "BCAc", Convallatoxolacetonidborsäureester "CAcBE", Nikotinyl-k-Strophanthidin "NS", Nikotinyl-k-Strophanthidin-Methoiodid "NSM", 3-α-Methyl-Digitoxigenin-ß-glucosid "AL 107") und mit der von 11 natürlichen Herzglykosiden verglichen.

1) Pharmakodynamische Untersuchungen

An isolierten elektrisch gereizten linken Vorhöfen des Meerschweinchens besitzen alle Cardenolide eine positiv inotrope Wirkung. Sie unterscheiden sich aber deutlich bezüglich ihrer Affinität, ihrer Wirkungsgeschwindigkeit, ihrer Abklingzeit, der Steilheit ihrer Konzentrations-Wirkungskurve und nur wenig bezüglich der intrinsischen Aktivität.

a) Die Affinität der Convallatoxinderivate (Convallatoxin, Methylconvallatoxin, CAc, BCAc und CAcBE) nimmt mit steigender Anzahl der freien Hydroxylgruppen im Zuckerteil zu. Eine Ausnahme bildet der Borsäureester CAcBE mit der höchsten Affinität unter den 5 Analogen und auch allen anderen untersuchten Cardenoliden. Die hohe Affinität ist vermutlich auf die Ester-Bindung an C5 und C19 zurückzuführen. Wegen ihrer flachen Konzentrations-Wirkungskurven haben CAcBE und BCAc möglicherweise die größte therapeutische Breite in dieser Gruppe.

b) Das quaternäre NSM hat im Vergleich zu NS eine höhere Affinität zum Herzgewebe, einen schnelleren Wirkungseintritt und eine geringere Haftbarkeit.

c) Das Digitoxigeninderivat AL 107 hat eine 100-fach niedrigere Affinität zum Herzgewebe als Digitoxin. AL 107 ist im Gegensatz zu Digitoxin schnell wirksam und läßt sich schnell auswaschen. Die Konzentrations-Wirkungskurve von AL 107 ist flacher als die von Digitoxin, was auf eine größere therapeutische Breite für AL 107 hinweist.

d) Die positiv inotrope Wirkung der Herzglykoside ist bei Verminderung der extrazellulären Calciumkonzentration abgeschwächt. Die Wirkung von Dihydroouabain, CAc und AL 107 ist im Vergleich zu den anderen Cardenoliden weniger von der äußeren Ca^{2+}-Konzentration abhängig.

e) Die Wirkung der Cardenolide auf den Papillarmuskel des Meerschweinchens entspricht qualitativ derjenigen an linken Vorhöfen.

2) Biochemische Untersuchungen

Verdrängungsversuche von ^{3}H-Ouabain zeigen, daß die Cardenolide bezüglich ihrer Affinität die gleiche Reihenfolge wie am Vorhof haben: In Bindungsstudien an Meerschweinchen-Herzhomogenaten haben CAcBE und Digitoxin die höchste und NSM und AL 107 die niedrigste Affinität. Die Aktivität der Na^{+},K^{+}-ATPase wird durch Digitoxin bei niedrigsten, durch NSM und AL 107 wiederum erst bei höchsten Konzentrationen gehemmt.

Für die verschiedenen Cardenolide besteht eine gute Korrelation zwischen den Konzentrationen der halbmaximalen Steigerung der Kontraktionskraft am Vorhof (EC_{50}), der halbmaximalen Hemmung der Na^+,K^+-ATPase (I_{50}) und der Affinität in Bindungsstudien (K_{Dx}) ($r > 0,96$). Dabei beträgt der Quotient EC_{50}/I_{50} im Mittel 0,4, der Quotient EC_{50}/K_{Dx} im Mittel 2,9, was darauf hinweist, daß die Bindung bei niedrigeren Konzentrationen erfolgt als der positiv inotrope Effekt, die Hemmung der Na^+,K^+-ATPase dagegen bei höheren Konzentrationen zustande kommt.

F. Literaturverzeichnis

Akera, T., Larsen, F.S., Brody, T.M.: The effect of ouabain on Na^+ and K^+-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. J. Pharm. Exp. Ther. 170, 17-26, 1969

Akera, T., Larsen, F.S., Brody, T.M.: Correlation of cardiac sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase with ouabain-induced inotropic stimulation. J. Pharm. Exp. Ther. 173, 145-151, 1970

Akera, T.: Quantitative aspects of the interaction between ouabain and the Na^+-K^+-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 245, 53-62, 1971

Akera, T., Baskin, S.I., Tobin, T., Brody, T.M.: Ouabain temporal relationship between the inotropic effect and the in vitro binding to and dissociation from (Na^++K^+)-activated ATPase. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 151-162, 1973

Akera, T., Brody, T.H.: The role of Na^+,K^+-ATPase in the inotropic action of digitalis. Pharmacological review 29, 187-220, 1978

Albrecht, H.P., Kunz, B.: Synthese von C-3-verzweigten Steroiden der Cardenolidreihe. Liebigs Ann. Chem., 2216-2226, 1975

Albrecht, H.P., Neugebauer, G.: Ger. Offen. 2'336'445, C.A. 82, 140395a, 1975

Albrecht, H.P., Neugebauer, G.: Ger. Offen. 2'427'977, C.A. 122155 j, 1976

Albrecht, H.P., Neugebauer, G.: Ger. Offen. 2'517'293, C.A. 86, 140414p, 1977

Alken, R.G., Fricke, U., Klaus, W.: Divergent influence of Ca^{2+} on the action of several cardiotonic steroids in isolated heart muscle preparations. Eur. J. Pharm. 26, 331-337, 1974

Beller, G.A., Smith, T.W., Abelmann, W.H., Haber, E., Hood, W.B.: Digitalis intoxication. A prospective clinical study with serum level correlations. N. Engl. J. Med. 284, 989-997, 1971

Bentfeld, M., Lüllmann, H., Peters, T., Proppe, D.: Interdependence of ion transport and the action of ouabain in heart muscle. Br. J. Pharm. 61, 19-27, 1977

Besch, H.R., Jr., Allen, J.C., Glick, G., Schwartz, A.: Correlation between the inotropic action of ouabain and its effects on subcellular enzyme system from canine myocardium. J. Pharm. Exp. Ther., 171, 1-12, 1970

Besch, H.R., Jr., Schwartz, A.: On the mechanism of action of digitalis. J. Med. Cell. Cardiol. 1, 195-199, 1970

Brandt, R., Stöcklin, W., Reichstein, T.: Alloglaucotoxigenin, Sturkturbestimmung. Helv. Clin. Acta 49, 1662-1680, 1966

Brown, L., Bontagy, J., Thomas, R.: Cardenolide Analogues: 11. Improved method for the use of Fétizon's reagent in the synthesis of cardiac glycosides. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 31, II, Nr. 7, 1059-1964, 1981

Cardwell, R.W., Nash, C.B.: Pharmacological studies of a new 4-amino sugar cardiac glycoside (ASI-222). J. Pharm. Exp. Ther. 197, 19-26, 1976

Cardwell, R.W., Nash, C.B.: Comparison of the effect of amino sugar cardiac glycosides with ouabain and digoxin on Na^+-K^+-ATPase and cardiac contractile force. J. Pharm. Exp. Ther. 204, 141-148, 1978

Charnock, J.S., Dryden, W.F., Marshall, R.J., Lauzon, P.: Dissociation of the inotropic and toxic effects of the semi-synthetic cardiac glycoside acetodigin during hibernation the ground sqirrel. Comp. Biochem. Physiol. 67 C, 1-7, 1980 a

Charnock, J.S., Dryden, W.F., Lauzon, P.A.: Species difference in myocardial response to actodigin: correlation with inhibition of myocardial (Na^++K^+)-ATPase. Comp. Biochem. Physiol. 66 C, 153-158, 1980 b

Chen. K.K.: Newer cardiac glycosides and aglycones. J. Med. Chem. 13, 1029-1034, 1970

Chen, C., Fricke, U.: Effect of potassium on the action of semisynthetic digitalis glycosides in guinea-pig isolated cardiac muscle. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., Suppl. 316 R, 142, 1981

Choay, P., Cordboeuf, E., Deroubaixe, E.: Electrophysiological and inotropic effects of natural amino-deoxyglyco-cardenolides. Eur. J. of Pharm. 50, 317-323, 1978

Chung, E.K.: In Digitalis Intoxication. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1969

Cook, L.S., Cardwell, R.W., Nash, C.B.: Comparison of the cardiac effects of AST-222 HCl an aminosugar cardiac glycoside and digoxin. Arch. int. Pharmacodyn. 227, 220-232, 1977

Dahmen, M., Greeff, K.: Analysis of the positive inotropic activity of the benzimidazole derivative ARL-115 BS in isolated guinea-pig atria. Arzneim. Forsch./Drug Res. 31, 161-165, 1981

Dal Pra, P., Rossini, L., Segre, G.: The kinetics of ouabain uptake in frog heart in relation to the kinetics of inotropic effect and to the activation of transport ATPase. Pharmacol. Res. Commun. 2, 177-191, 1970

Doering, W., König, E., Sturm, W.: Digitalisintoxikation: Wertigkeit klinischer und elektrokardiographischer Befunde im Vergleich zur Digoxinkonzentration im Serum. 1. Teil: Patienten mit digitalisinduzierten Rhythmusstörungen. Z. Kardiol. 66, 121, 1977 a

Doering, W., König, E., Sturm, W.: Digitalisintoxikation: Wertigkeit klinischer und elektrokardiographischer Befunde im Vergleich zur Digoxinkonzentration im Serum. 2. Teil: Patienten mit klinischen Hinweisen für eine Digitalisintoxikation. Z. Kardiol. 66, 129, 1977 b

Dransfeld, H., Greeff, K., Berger, H., Cautins, V.: Die verschiedene Empfindlichkeit der Natrium und Kalium aktivierten ATPase des Herz- und Skelettmuskels gegen k-Strophanthin. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharm. 254, 225-234, 1966

Dudek, M., Mantel, H.R.: Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß der extrazellulären Calciumkonzentration auf positiv inotrope Wirkung von Digitoxin und Isoproterenol am isolierten Vorhof des Meerschweinchens. Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät, Düsseldorf 1979

Dutta, S., Goswrami, S., Datta, D.K., Lindower, J.O., Marks, B.H.: The uptake and binding of six radiolabelled cardiac glycosides by guinea-pig hearts and by isolated sarcoplasmic reticulum. J. Pharm. Exp. Ther. 164, 10-21, 1968

Dutta, S., Marks, B.H.: Factors that regulate ouabain-H^3 accumulation by the isolated guinea-pig heart. J. of Pharm. Exp. Ther., 170, 318-325, 1969

Erdmann, E., Bolte, H.D., Lüderitz, B.: The (Na^+-K^+)-ATPase activity of guinea-pig heart muscle in potassium deficiency. Arch. Biochem. Biophys. 145, 121, 1971

Erdmann, E., Schoner, W.: Ouabain-receptor interactions in (Na^++K^+)-ATPase preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 283, 335-356, 1974

Fath, R., Kraft, D., Mancke, A., Peters, Th., Pulß, W.: Pharmacological characterization of some new semisynthetic cardiac glycosides. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., 307, R 37, 1979

Förster, W. und Pâvek, K.: Über Struktur-Wirkungsbeziehungen und qualitative Wirkungsunterschiede zwischen g-Strophanthin, Convallatoxin, Helveticosid und Cymarin. Arch. int. Pharmacodyn., 148, 471-486, 1964

Foussard-Blanpin, O., Hubert, F., Choay, P., Leboeuf, M.: Alcaloides stéroidiques - Activité cardiotonique de la mitiphylline, premier amino-désoxyglyco-cardinolide isolé des feuilles de l'Holarrhena mitis, Ann. pharm. frac., 31, 593-600, 1973

Fox, A.A.L.: Charakterisierung der Wirkungsmechanismen von Hemmstoffen der Na^+-,K^+-aktivierbaren, Mg^{2+}-abhängigen Adenosin-Triphosphatase. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Düsseldorf, 1979

Fox, A.A.L., Höltershinken, K.: The action of 3α-Methyldigitoxigeninglucoside on isolated procine coronary arteries. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., ,Suppl. 319, R 43, 171, 1982

Fricke, U., Klaus, W.: Evidence for two different Na^+-dependent [^{3}H]-ouabain binding sites of a Na^+-K^+-ATPase of guinea-pig hearts. Br. J. Pharm. 61, 423-428, 1977

Fricke, U., Klaus, W.: Sodium-dependent cardiac glycoside binding: experimental evidence and hypothesis. Br. J. Pharm. 62, 255-257, 1978

Fricke, U., Klaus, W., Rogatti, M.: Active site-directed alkylation of Na^+-K^+-ATPase by digitalis sulphonate derivatives of different lipophilicity. Br. J. Pharm. 72, 25-29, 1981

Fricke, U., Chen, C.X.: On the influence of potassium on the wash-out kinetics of tritiated digitalisglycosides in the isolated guinea-pig heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. Suppl. 319 R 42, 166, 1982

Fritz, P.J., Hamrick, M.E.: Enzymatic analysis of adenosine triphosphatase. Enzymol. Acta Biocat. 30, 57-64, 1966

Gelbart, A., Goldman, R.H.: Correlation between microsomal (Na^++K^+)-ATPase activity and [^{3}H]ouabain binding to heart tissue homogenates. Biochim. Biophys. Acta 481, 689-694, 1977

Gervais, A., Lane, L.K., Anner, B.M., Lindemayer, G.E., Schwartz, A.: A possible molecular mechanism of the action of digitalis: Ouabain action on calcium-potassium-activated adenosine triphosphatase from kidney. Circ. Res. 40, 8, 1977

Gilfrich, H.J., Schölmerich, P.: Digitalisintoxikation. Dtsch. Med. Wochenschr. 100, 831, 1975

Glynn, I.M.: The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev. 16, 381-407, 1964

Goldstein, A., Arrow, L., Kalman, S.M.: In Principles of Drug Action, p. 388, John Wiley & Sons, New York, 1974

Goltsman, M.S., Schrire, V.: Toxicity - a frequent complication of digitalis therapy. S. Aft. Med. J. 40,590, 1966

Greeff, K.: Zur Pharmakologie der herzwirksamen Glykoside. Die Wirkung der Glykoside auf den Stoffwechsel des Herzmuskels. Klin. Physiol. 1, 340-370, 1963

Greeff, K., Schlieper, E.: Artspezifische Wirkungsunterschiede des k-Strophanthins und Prednisolonbisguanylhydrazons. Arch. int. Pharmacodyn. 166, 350-361, 1967

Greeff, K., Pereira, E., Wagner, J.: Die Wirkung des Strophanthins bei Änderung der Schlagfrequenz und der extrazellulären K^+ und Ca^{++}-Konzentration. Archives internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie 190, 219- 228, 1971

Greeff, K., Bonn, R., Noack, E.: Studies on the mechanism of cardiac glycosides. Rev. Hung. Acad. Sci., 97-104, 1974

Greeff, K., Hafner, D.: Evaluation of cardiac glycosides in isolated heart preparation other than papillary muscle. In: Cardiac Glycosides, K. Greeff (ed.), Handbuch Exp. Pharm., Vol 56/I, 161-184, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1981

Greenberger, N.J., Mac Dermott, R.P., Martin, J.F., Dutta, S.: Intestinal absorption of six tritium-labelled digitalis glycosides in rats and guinea-pigs. J. Pharm. Exp. Ther. 167, 265-273, 1969

Hackenberg, U., Bartling, H.: Messen und Rechnen im pharmakologischen Laboratorium mit einem speziellen Zahlensystem (WL 24-System). Naunyn-Schmiedeberg's Arch exp. Path. u. Pharm. 235, 437-463, 1959

Hafner, D., Heinen, E., Noack, E.: Mathematical analysis of concentration-response relationships. Method for the evaluation of the ED_{50} and the number of binding sites per receptor molecule using the logit transformation. Drug Research 27, 1871-1873, 1977

Hasselbach, W.: Relaxing factor and relaxation of muscle. Progr. in Biophysics, 14, 167-222, 1964

Hatcher, R., Brody,T.M.: Biologische Standardisierung von Drogen. Amer. J. Pharmacy 82, 360, 1910

Haustein, K.O., Markwardt, F., Repke, K.: Über die unterschiedliche Darmwirksamkeit von Digitoxin, Penta-acetyl-gitoxin und anderen Acetyl-gitoxinen.Arch. exp. Path. Pharmakol. 252, 424-432, 1965

Haustein, K.O.: Comparison of therapeutic and toxic action of ouabain, gitoxin and 16-epi-gitoxin on isolated atria at different extracellular potassium concentration. Eur. J. Pharm. 21, 195-202, 1973

Haustein, K.O.: Studies on cardioactive steroids. I. Structure-activity relationship on the isolated atrium. Pharmacology 11, 117-126, 1974

Haustein, K.O., Glusa, E., Megges, R.: Studies on cardioactive steroids. IV. Influence of nitrate ester formation on cardiac and extracardiac activity. Pharmacology 20, 15-20, 1980

Hegyvary, C., Chigurupati, R., Mahoney, D.: Do membrane lipids modify the ouabain-sensitivity of cardiac (Na,K)ATPase? Research Communication in Chemical Pathology and Pharmacology 31, 195-203, 1981

Henderson, F.G., Chen, K.K.: Cardiac activity of newer digitalis glycosides and aglycones. J. Med. Clin. 5, 988-995, 1962

Henderson, F.G., Chen, K.K.: Cardiac glycosides and aglycones by synthesis and microbiological conversion. J. Med. Chem. 8, 577-579, 1965

Herbst, A.: Influence of digitoxin, digitoxigenin and α-methyl-digitoxigenin-glucoside on cellular Na^+- and K^+-content of isolated left guinea-pig atria. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., Suppl. 311, R 41, 161, 1980

Hilden, S., Rhee, H.M., Hokin, L.E.: Sodium transport by phospholipid vesicles containing purified sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., 249, 7432-7440, 1974

Hoffmann, J.F.: The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. Am. J. Med. 41, 666, 1966

Hurwitz, N., Wade, O.L.: Intensive hospital monitoring of adverse reactions to drugs. Brit. Med. J. 1, 531-536, 1969

Juhasz, G., Tamm, Ch.: Umwandlung von Cardenoliden durch Mikroorganismen. IV. 7-ß-Hydroxylierung von Digitoxigenin durch Aspergillus oryzae (AHLB) Cohn, Rizopus arrhizus Fischer und Trichothecium rosen Link (Cephalothecium roseum CDA). Helv. Chim. Acta 44, 1063-1076, 1961

Klatt, J.: Influence of the frequency of contraction on the dose-response-relationship of ouabain, digitoxigenin, and α-methyl-digitoxigenin-glucoside in isolated guinea-pig left atria. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., Suppl. 311, R 41, 164, 1980

Knaffl-Lenz, E.: Die physiologische Prüfung von Digitalis Präparaten. J. of Pharmacol. 29, 407-425, 1926

Kovarikova, A., Kolarova, H., Pitra, J.: Einfluß der 16-Hydroxylgruppe auf die Aktivität der Kardenolide. Die inotrope Aktivität des 16-epi-gitoxigenin. Experienta 20, 263-264, 1964

Ku, D., Akera, T., Pew, C.L., Brody, T.M.: Cardiac glycosides: Correlations among Na^+,K^+-ATPase, Na pump and contractility in guinea-pig heart. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 285, 185-200, 1974

Langer, G.A.: The intrinsic control of myocardial contraction-ionic factors.New Engl. J. Med. 285, 1065, 1971

Langer, G.A.: Relationship between myocardial contractility and the effects of digitalis on ionic exchange. Fed. Proc. 36, 2231-2234, 1977

Langer, G.A.: The structure and function of the myocardial cell surface. Am. J. Physiol. 235, 461, 1978

Langer, G.A.: The role of calcium in the control of myocardial contractility: An update. J. Mol. Cell. Cardiol. 12, 231, 1980

Langer, G.A.: Mechanism of action of the cardiac glycosides on the heart. Biochem. Pharm. 30, 3261-3264, 1981

Lee, K.S., Shin, M.R., Kang, D.H., Chan, K.K.: Studies on the mechanism of cardiac glycosides action. Biochem. Pharm. 19, 1055-1059, 1970

Lendle, L.: Über herzwirksame Glykoside. Pharmakologische Beeinflussung der Strophanthinwirkung am Herzen bei der Titration nach Hatcher. Arch. Exp. Path. 169, 583-603, 1933

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265, 1951

Luchi, R.J., Conn, H.L.: Digitalis action on the cells: Fable, fact and fancy. Prog. Cardiovasc. Dis. 7, 336-359, 1965

Lüllmann, H., Peters, T., Ziegler, A.: Kinetic events determining the effects of cardiac glycosides. TIPS 1, 102-106, 1979

Lüllmann, H., Mohr, K.: On the binding of a 3-α-methylated digitoxigenin-glucoside to ouabain receptors in heart muscle homogenate. Biochem. Pharm. 31, 2489-2494, 1982

Mendez, R., Pastelin, G., Kabela, E.: The influence of the position of attachment of the lactone ring to the steroid nucleus on the action of cardiac glycosides. J. Pharm. Exp. Ther. 188, 189-197, 1974

Murthy, R.V., Kidwai, A.H., Daniel, E.E.: Dissociation of contractile effect and binding and inhibition of Na^+-K^+-Adenosine triphosphatase by cardiac glycosides in rabbit myometrium. J. Pharm. Exp. Ther. 188, 575-581, 1974

Nakamura, Y., Schwartz, A.: Possible control of intracellular calcium metabolism by (H^+): Sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle and cardiac muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 830-836, 1970

Nakao, T., Tashima, K., Nagano, K., Nakao, M.: Highly specific sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase from various tissues of rabbit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 755, 1965

Niehus, W., Pulss, W., Ravens, U.: The effects of digitoxigenin-, proscillaridin- and scillarenin-derivatives on the electrical and mechanical activities of guinea-pig papillary muscles. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. Suppl. 311, R 41, 163, 1980

Okita, G.T., Richardson, F., Roth-Schechter, B.F.: Dissociation of the positive inotropic action of digitalis from inhibition of Na^+,K^+-ATPase. J. Pharm. Exp. Ther. 185, 1-11, 1973

Okita, G.T.: Dissociation of Na^+,K^+-ATPase inhibition from digitalis inotropy. Federation Proc. 36, 2225-2230, 1977

Park, M.K., Vincenzi, F.F.: Rate of onset of cardiotonic steroidinduced inotropism: Influence of temperature and beat interval. J. Pharm. Exp. Ther. 195, 140-150, 1975

Pastelin, G., Mendez, R.: Singular effects of a new short acting cardiac glycoside in Purkinje cell. Eur. J. Pharm. 19, 291-293, 1972

Patnaik, G.K., Dhawan, B.N.: Pharmacological investigations on Asclepin- a new cardenolide from Asclepias curassavica. Arzneim. Forsch./Drug Res. 28 (II), 1095-1099, 1978

Patnaik, G.K., Koehler, E.: Pharmacological investigation on Asclepin - a new cardenolide from Asclepias curassavica. Arzneim. Forsch./Drug Res. 28 (II), 1368-1372, 1978

Perrone, J.R., Blostein, R.: Asymmetric interaction of inside-out and right-side-out erythrocyte membrane vesicle with ouabain. Biochim. Biophys. Acta 291, 680-689, 1973

Peters, T., Raben, R.H., Wassermann, O.: Evidence for dissociation between positive inotropic effect and inhibition of the Na^+-K^+ ATPase by ouabain, cassaine and their alkylating derivatives. Eur. J. Pharm. 26, 166-174, 1974

Peters, T.: Dependence of the dose-response relationship for cardiac glycosides on the experimental condition. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., Suppl. 319, R 43, 172, 1982

Pitts, B.J.R., Schwartz, A.: Improved purification and partial characterization of (Na^+,K^+)-ATPase from cardiac muscle. Biochim. et Biophys. Acta 401, 184-195, 1975

Philipsborn, G.V.: Inotropic and toxic effect of 3-α-methyl-digitoxigeninglucosid (AL 107) and digitoxigeninglucosid (DIG). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm., Suppl. 316, R 36, 143, 1981

Prindle, K.H., Skelton, C.L., Epstein, S.E., Marcus, F.: Influence of extracellular potassium concentration on myocardial uptake and inotropic effect of tritiated digoxin. Cir. Res. 28, 337-345, 1971

Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., Racker, E.: Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. J. Biol. Chem. 235, 3322-3329, 1960

Reiter, M.: Die Beziehung von Calcium und Natrium zur inotropen Glykosidwirkung. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. und Pharm. , 245, 487-499, 1963

Reiter, M.: Pharmakologie der Digitaliswirkung. Verh. Dtsch. Ges. Kreislaufforschung 34, 87-98, 1968

Reiter, M.: The use of the isolated papillary muscle for the evaluation of positive inotropic effects of cardiac steroids. In: Cardiac Glykosides, K.Greeff (Ed.), Handb. Exp. Pharm. Vol. 56/I, 153-159, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1981

Repke, K., Portius, H.J.: Über die Identität der Ionenpumpen ATPase in der Zellmembran des Herzmuskels mit einem Digitalis-Rezeptorenzym. Experientia (Basel) 19, 452-458, 1963

Repke, K.: Effect of digitalis on membrane adenosine triphosphatase of cardiac muscle. In: Proceedings of second internation pharmacological meeting, Prague, Vol. 4, Drugs and Enzyme, Ed.: B.B.Brodie and J.R. Gillette, 65-88, New York: Pergamon Press, 1965

Repke, K., Est, M., Portius, H.J.: Über die Ursache der Speciesunterschiede in der Digitalisempfindlichkeit. Biochem. Pharm. 14, 1785-1802, 1965

Rhee, H.M., Dutta, S., Marks, B.H.: Cardiac Na^+-K^+-ATPase activity during positive inotropic and toxic action of ouabain. Eur. J. Pharm. 37, 141-153, 1976

Roth-Schechter, B.F., Okita, G.T., Thomas, R.E., Richardson,F.F.: On the positive inotropic action of alkylating bromoacetates of strophanthidin and strophanthidol-[-19-H^3]. J. Pharm. Exp. Ther. 171, 13-19, 1970

Schädler, M.: Proportionale Aktivierung von ATPase-Aktivität und Kontraktionsspannung durch Calciumionen in isolierten contractilen Strukturen verschiedener Muskelarten. Pflügers Arch. 296, 70-90, 1967

Scheller, F., Megges, R., Dittrich, D., Repke, K., Protius, H.J., Kammann, G., Schmidt, H.J., Haustein, K.O.: Verfahren zur Herstellung von Salpetersäureester. DDR-Wirtschaftspatent Nr. 113355 vom 5.6.1975

Schlegel, W., Tamm, Ch., Reichstein, R.: Die Konstitution von Acovenosid A. Helv. Chim. Acta 38, 1013-1025, 1955

Schwartz, A., Allen, J.C., Harigaya, S.: Possible involvement of cardiac Na^+,K^+ adenosine triphosphatase in the mechanism of action of cardiac glycosides. J. Pharm. Exp. Ther. 168, 31-41, 1969

Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., Allen, J.C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase; pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharmacol. Rev. 27, 3-134, 1975

Siebeneick, H.K., Hoffmann, W.: Inhibition of beef-brain and dog-heart (Na^++K^+)activated adenosine triphosphatase by carbon-3-branched cardenolides. J. Med. Chem. 21, 1310-1312, 1978

Shapiro, S., Slone, D., Lewis, G.R.: The epidemiology of digoxin: a study in three Boston hospitals. J. Chron. Dis. 22, 361, 1969

Skou, J.C.: The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. Biochem. biphys. Acta (Amst.) 23, 394-401, 1957

Skou, J.C.: Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45, 596, 1965

Smith, T.W.: Digitalis toxicity: Epidemiology and clinical use of serum concentration measurements. Am. J. Med. 58, 470, 1975

Stevens, C.L., Ransford, G.H., Gutowski, G.E.: Aminohexose cardiac glykosides. American Chemical Society Abs MED 109, Atlantic City, 1968

Sukenobu Ito: A comparative study on the electrical and mechanical properties of human and guinea-pig atrial muscle in vitro. Japanese Circulation Journal 39, 37-47, 1975

Tamm, C.: The stereochemistry of the glycosides in relation to biological activity. Proc. 1st intern. pharm. meeting, 3, 11-26, Stockholm-Oxford, Pergamon Press, 1963

Temma, K., Akera, T., Brody, T.M., Kondo, H.: A comparison of inotropic actions of p-chloromercaribenzoate, ouabain, digitoxin and digitoxigenin. Eur. J. Pharm. 77, 289-298, 1982

Ten Eick, R.E., Basset, A.L., Okita, G.T.: Dissociation of electrophysiological and inotropic action of strophanthidin-3-bromoacetate: possible role of adenosine triphosphatase in the maintenance of the myocardial transmembrane Na^+ and K^+ gradients. J. Pharm. Exp. Ther., 185, 12-23, 1973

Thomas, R., Boutagy, J., Gelbart, A.: Cardenolide analogs: V. Cardiotonic activity of semisynthetic analogs of digitoxigenin. J. of Pharm. Exp. Therap. Vol. 191, 219-231, 1974

Thomas, R., Allen, J., Pitts, B., Schwartz, A.: Cardenolide analogs: An explanation for the usual properties of AY 22241. Eur. J. Pharm. 53, 227-237, 1979

Tsuru, H., Ishikawa, N., Shigei, T., Anjyo, T., Okada, M.: Cardiotonic action of ring A-modified cardenolides with special reference to cleavage of the ring. Japan. J. Pharm. 27, 799-805, 1977

Yamamoto, S., Fox, A.A.L., Greeff, K.: Inotropic effects and Na^+,K^+-ATPase inhibition of ouabain in isolated guinea-pig and diaphragm. Eur. J. of Pharm. 71, 437-446, 1981

Yoda, A., Hokin, L.E.: On the reversibility of binding of cardiotonic steroids to a partially purified (Na^+,K^+)-activated adenosinetriphosphatase from beef brain. Bioch. and Biophys.Research Communications 40, 880-886, 1970

Yoda, A.: Structure activity relationship of cardiotonic steroids for the inhibition of Na^+-K^+-ATPase.1)Dissociation rate constants of various enzyme-cardiac glycoside complex formed in the presence of Mg^{++} and phosphate. Molecular Pharmacology 9, 51-60, 1973

Weese, H.: Digitalis. Ed. H. Weese, Georg Thieme Verlag, Leipzig, 1936

Zavecz, J.H., Dutta, S.: The relationship between Na^+,K^+-ATPase inhibition and cardiac glycoside-induced arrhythmia in dogs. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm. 297, 91-98, 1977

Zorbach, W., Pietsch, G.: Teilsynthese der anomeren 2-Desoxy-Glucopyranoside des Digitoxigenins. Ann. 655, 25-35, 1962

LEBENSLAUF

Name:		Hoda Tawfik
Geburtsdatum:		10. Mai 1955
Geburtsort:		Kairo/Ägypten
Eltern:		Vater: Prof. Dr. Ing. Ahmed Tawfik Mutter: Dr. Siadat Zaki, Prof. für Pharmazeutische Technologie
Adresse:		24, el Kods el Sheriff str. Mohandessin, Kairo/Ägypten
Ausbildung:	1958-1974	Besuch der Deutschen Evangelischen Oberschule in Kairo (Kindergarten - Abitur)
	Juni 1973	Ägyptische Reifeprüfung
	Oktober 1973	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität in Kairo
	Mai 1974	Deutsche Reifeprüfung (Abitur)
	Mai 1978	Bakkalaureus-Prüfung (Staatsexamen), Durchschnitt "ausgezeichnet"
Berufliche Tätigkeit:		
	1979-1980	Assistent im Institut für Pharmakologie der Pharmazeutischen Fakultät der Universität Kairo
	1979-1980	"Post-graduate courses for the master"
	1980	Stipendium des DAAD zur Anfertigung einer Dissertation für Absolventen der Deutschen Evangelischen Oberschule Kairo
	April 1980	Beginn der Tätigkeit am Institut für Pharmakologie der Universität Düsseldorf

Herrn Professor Dr. med. K. Greeff danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. A.A.L. Fox und Frau J. Brühne für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.